Chromosoma, (Berl.), Bd. 9, S. 269—285 (1958)

Aus dem Forstbotanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

ANEUPLOIDE CHROMOSOMENZAHLEN IN DEN MITOSEN DER LEBER VERSCHIEDEN ALTER RATTEN*

Von

EBERHARD GLÄSS

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Februar/2. Mai 1958)

Einleitung

In einer vorhergehenden Arbeit haben wir über die Chromosomenzahlen in den Leberzellen von Ratten verschiedenen Alters berichtet (MARQUARDT und GLÄSS 1957a). An über 1500, in ihrer Chromosomenzahl genau bestimmten Metaphasen hat sich dabei im wesentlichen gezeigt, daß die Leberzellen neugeborener Ratten vorwiegend die diploide Chromosomenzahl besitzen, im Laufe der weiteren Entwicklung aber haploide, diploide, polyploide und aneuploide Zahlen sehr stark zunehmen. Dabei kommt ein bestimmtes „Mitosemuster" zustande; das Verhältnis der Kerne mit diploiden, polyploiden und aneuploiden Chromosomenzahlen erscheint festgelegt und nicht durch den bloßen Zufall bedingt. Dieses Mitosemuster ist bereits bei neugeborenen Tieren ausgebildet und ist in seiner Zusammensetzung von der entsprechenden Altersstufe abhängig.

In dieser vorhergehenden Publikation haben wir nur die *Gesamtzahl* der aneuploiden Mitosen berücksichtigt und diese Gruppe zunächst nicht weiter aufgegliedert. Diese Lücke soll in der vorliegenden Arbeit ausgefüllt und gleichzeitig das Phänomen der Genomsonderung (GLÄSS 1956, 1957a) an den aneuploiden Metaphasen erneut überprüft werden. Wir glauben auf diese Weise nicht nur die Einsichten in die Chromosomenverhältnisse der unbehandelten Rattenleber erweitern zu können, sondern darüber hinaus auf Grund der verhältnismäßig großen Zahl genau analysierter Metaphasen einen Beitrag zu der heute viel diskutierten Frage zu leisten, in welchem Umfang und nach welchen Gesetzmäßigkeiten aneuploide Chromosomenzahlen in den Organen der Säugetiere vorhanden sind.

Material und Methode

Es handelt sich hier um dasselbe Tiermaterial wie bei unseren früheren Veröffentlichungen (GLÄSS 1956, 1957a, b; MARQUARDT und GLÄSS 1957a); wir untersuchten dabei 4 Altersstufen: 12 Std, 6 Tage, 6 Monate und 11 Monate alte Tiere. Um genügend Kernteilungen zu erhalten, mußten die Lebern der 6 und 11 Monate

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

alten Tiere 48 Std vor der Fixierung partiell hepatektomiert werden. Eines der Tiere wurde dabei stärker als sonst üblich hepatektomiert, um Einblick in das Verhalten der aneuploiden Mitosen bei stärkerer funktioneller Belastung der Leber zu bekommen.

Die von uns verwendeten Methoden sind bei MARQUARDT und GLÄSS (1957a) eingehend beschrieben. Die Auswertung erfolgte an Hand von Quetschpräparaten mit Phasenkontrastoptik.

Experimenteller Teil

I. Die Gliederung der aneuploiden Mitosen nach den verschiedenen Ploidiestufen

Zunächst war festzustellen, ob sich zwischen der Häufigkeit aneuploider und euploider Chromosomenzahlen Beziehungen feststellen lassen. Hierzu wurden die aneuploiden Chromosomenzahlen den euploiden entsprechend in verschiedene Ploidiestufen gegliedert, die betreffenden euploiden Chromosomenzahlen (21, 42, 63, 84, 105 usw.) als Mittel der Ploidiestufe gewertet und Metaphasen mit um 1 bis zu 10 vermehrten oder verminderten Chromosomenzahlen der jeweiligen Ploidiestufe zugeordnet. Auf diese Weise wurden z. B. alle jene Mitosen als eine der diploiden entsprechende aneuploide Stufe erfaßt, deren Chromosomenzahl zwischen 32 und 52 variiert.

In Tabelle 1 sind die Ploidiestufen von 1561 euploiden Metaphasen denen der 297 aufgefundenen aneuploiden Mitosen gegenübergestellt.

Tabelle 1. *Vergleich zwischen euploiden und aneuploiden Metaphasen in der unbehandelten Rattenleber*

	Ploidiestufe							
	1 n (21)	2 n (42)	3 n (63)	4 n (84)	5n(105)	6 n (126)	7 n (147)	8—10 n
	Aneuploide Chromosomenzahlen							
	11—31	32—52	53—73	74—94	95—115	116—136	137—157	> 157
% euploid	6,1	73,6	7,0	10,2	1,7	0,8	0,2	0,4
% aneuploid . . .	20,2	35,4	28,6	12,1	2,0	1,0	0,7	—
euploid/aneuploid .	1:3,3	1:0,5	1:4,0	1:1,2	1:1,2	1:1,2	1:3,5	—

Ferner ist in der Tabelle das Verhältnis der euploiden zu den aneuploiden Mitosen in jeder Ploidiestufe angegeben. Zwischen euploiden und aneuploiden Chromosomenzahlen sind in den einzelnen Ploidiestufen charakteristische Differenzen vorhanden:

Bei euploiden Mitosen treten 2 Gipfelpunkte hervor: eine sehr große Häufigkeit von diploiden Mitosen (2n) und eine ebenfalls herausfallende, wenn auch den Umfang der 2n-Stadien bei weitem nicht erreichende Anzahl von 4n-Mitosen. Bei den Aneuploiden dagegen findet sich nur ein geringer Anstieg der Werte zwischen 1n und 2n, während daraufhin im Gegensatz zu den euploiden Mitosen die Zahl der aneuploiden in

allen höheren Ploidiestufen abnimmt (s. Tabelle 1). Auf diese Weise kommt es im diploiden Bereich zu dem Verhältnis der euploiden Mitosen zu den aneuploiden von 1:0,5, während in den übrigen Klassen Verhältniszahlen von 1:1,2 bis 1:3,5 vorgefunden werden.

Diese Ergebnisse sind deswegen unerwartet, weil zunächst die Annahme nahe lag, daß sich die aneuploiden Chromosomenzahlen in erster Linie durch Störungen der Kernteilungen von der jeweiligen euploiden Kernklasse ableiten ließen und daher die Zahl der aneuploiden Mitosen der Zahl der euploiden Mitosen ungefähr parallel gehen müßte. Gerade bei der diploiden Klasse ist dies aber nicht der Fall, so daß hier eine Sonderstellung der Aneuploiden innerhalb des Mitosemusters deutlich wird.

II. Die Altersabhängigkeit der aneuploiden Mitosen

Für die Häufigkeit der verschiedenen Aneuploidieklassen in den Lebern der 12 Std, 6 Tage, 6 Monate und 11 Monate alten Tiere ergeben sich sehr unterschiedliche Kurven (Abb. 1), und zwar 2 mit einem steilen Gipfel versehene bei den jungen, nicht hepatektomierten Tieren sowie 2 breitgipflige und dementsprechend niedrigere bei den älteren, hepatektomierten Tieren.

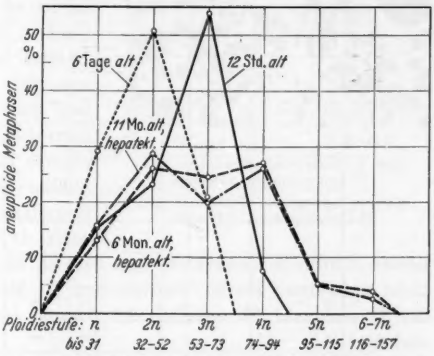

Abb. 1. Die Häufigkeit der aneuploiden Metaphasen in den verschiedenen Altersstufen. Ordinate: Prozentsatz der aneuploiden Metaphasen. Abszisse: Ploidiegrade

Die Kurven der 12 Std und 6 Tage alten Tiere sind jedoch nicht miteinander identisch; in den 6 Tage alten Lebern ist ein Rückgang der aneuploiden Stadien der 3n- und 4n-Stufe erfolgt. Daß trotz der geringen Zahl der Aneuploiden in den 12 Std alten Tieren diese Differenz wohl als real anzusehen ist, dafür spricht, daß auch bei den euploiden Mitosen ein analoger Rückgang vor allem der Häufigkeit tetra- und triploider Stadien gefunden wurde (MARQUARDT und GLÄSS 1957a). Im Lebensabschnitt von 12 Std bis 6 Tagen laufen also in der Rattenleber Vorgänge ab, durch die sowohl die Anzahl der euploiden wie auch die der aneuploiden Teilungsstadien in der 3n- und 4n-Klasse herabgesetzt wird.

Die Kurven für die 6 und 11 Monate alten, partiell hepatektomierten Tiere verlaufen dagegen wesentlich anders; die Werte der aneuploiden

2n-, 3n- und 4n-Stufe stimmen fast ganz miteinander überein, der Kurvenabfall tritt erst bei den 5n-Werten ein. In einer gewissen Parallele zu der Häufigkeitsverteilung der euploiden Mitosen ist bei den 11 Monate alten Tieren neben dem Hauptgipfel der 2n-Klasse ein weiterer bei der 4n-Stufe vorhanden (s. Abb. 1).

Es finden somit im Laufe der Entwicklung der Rattenleber nach der Geburt sowohl bei den euploiden wie auch bei den aneuploiden Zellen charakteristische Veränderungen statt, deren Richtung bei beiden Gruppen ähnlich ist.

III. Die Gliederung der aneuploiden Mitosen nach ihren Chromosomenzahlen

In den aneuploiden Metaphasen fanden sich Chromosomenzahlen zwischen 12 und 138 (s. Tabelle 2). Von den in diesem Bereich vorhandenen 121 möglichen aneuploiden Zahlen sind aber nur 28 beobachtet worden. Die Zahlen 27, 33, 54 und 75 sind, bei einem Gesamtmaterial von 297 aneuploiden Metaphasen, jede mit mehr als 25 Einzelkernen vertreten, so daß 77,8% aller aneuploiden Metaphasen eine dieser vier Zahlen aufweisen. Eine weitere Besonderheit der Aneuploiden liegt darin, daß die den euploiden benachbarten Chromosomenzahlen (um 21, 42, 63, 84, 105 usw.) überhaupt nicht auftreten. Ferner besitzen nur 10 Metaphasen eine Zahl unter der Haploidzahl 21, nämlich 12, 13 und 16 Chromosomen (s. Abb. 2 und 3).

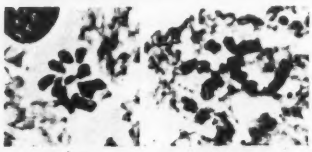

Abb. 2 Abb. 3

Abb. 2. Aneuploide Metaphase mit 12 Chromosomen. 3000mal

Abb. 3. Aneuploide Metaphase mit 16 Chromosomen. 3000mal

Im Mitosemuster der unbehandelten Rattenleber sind die aneuploiden Chromosomenzahlen also *nicht* zufallsgemäß verteilt. Dies ist um so interessanter, da ein derartiges Verhalten theoretisch nicht zu erwarten war; ferner fällt dadurch eine Ableitung der Aneuploiden durch Mitosestörungen weg.

IV. Die Altersabhängigkeit der aneuploiden Chromosomenzahlen

Bei 12 Std und 6 Tage alten, nicht hepatektomierten Tieren treten in 76 (=83,5%) von 91 aneuploiden Metaphasen die Zahlen 27, 33 und 54 auf (Abb. 4, s. Tabelle 2). Nach partieller Hepatektomie findet man in den Lebern der 6 und 11 Monate alten Tiere eine stärkere Mannigfaltigkeit der aneuploiden Chromosomenzahlen und dementsprechend einen Rückgang der Häufung von Mitosen mit 27, 33 und 54 Chromo-

Tabelle 2. *Die aneuploiden Chromosomenzahlen in den verschiedenen Altersstufen*

Versuchstiere		Chromosomenzahl																												
		12	13	16	27	33	35	36	37	44	48	49	50	54	57	58	60	67	69	74	75	78	79	90	96	98	99	117	138
12 Std alt	einzeln					1								2															
						1								4															
		1			3	4								8							2							
	zus.	1			3	6								14							2							
6 Tage alt	einzeln				6	9								6		1	1		1									
					5	11	1	3					2	3															
		2	1		5	7								1														
	zus.	2	1		16	27	1	3					2	10		1	1		1									
6 Monate alt, normal hepatektomiert	einzeln				2	1					1			2												1		
					2	2							2	2					1	1	2								
						3								3					3		7			1	1			1	1
	zus.				4	6					1		2	7					4	1	9			1	1		1	1	1
6 Monate alt, stark hepatektomiert				1	5	8			1	1		1		5	1			1	1		6	1	1	2	1	1		1	
11 Monate alt, normal hepatektomiert	einzeln	3			5	14	1	1					2	13					2	1	4			1					1
				1	7	11					1		1	11					1		2				1		1		
		1			10	13		1			1			8		1	1		2		5							1	
	zus.	4		1	22	38	1	2			2		3	32		1	1		5	1	11			1	1		1	1	1
Gesamt		7	1	2	50	85	2	5	1	1	3	1	7	68	1	2	2	1	11	2	28	1	1	4	3	1	2	3	2

somen auf 61,7%; dafür kommen als bevorzugt die Zahlen 69 und 75 mit zusammen 17,5% hinzu. Das eine Tier, dessen Leber besonders stark hepatektomiert wurde, zeigt, verglichen mit den anderen 6 Monate alten Tieren, eine ausgeprägtere Streuung der Werte, sonst aber keine Besonderheiten (Tabelle 2). Wie die Tabelle zeigt, kommt fast die Hälfte aller nicht bevorzugten aneuploiden Zahlen in diesem einen, stärker hepatektomierten Tiere vor, während sich der Rest auf die übrigen Tiere verteilt. Durch die mit der verstärkten Hepatektomie verbundene erhöhte Belastung der Leber wird demnach eine umfangreichere Zahl aneuploider Mitosen ausgelöst, deren Chromosomenzahlen sich anders verhalten als die der normal hepatektomierten Tiere.

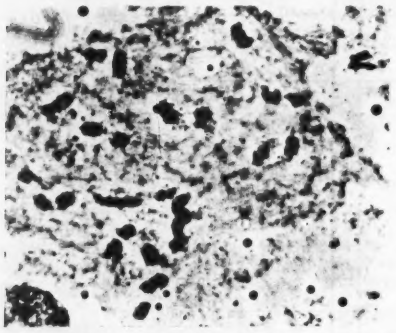

Abb. 4. Aneuploide Metaphase mit 27 Chromosomen. 3000mal

V. Die verschiedenen Möglichkeiten der Genomsonderung in aneuploiden Metaphasen

Als Genomsonderung bezeichneten wir (GLÄSS 1956) die innerhalb einer Metaphase auftretende lagemäßige Gruppierung bzw. Sonderung von homologen Chromosomensätzen. Dieses Phänomen wurde in allen Ploidiegraden gefunden und in seinen verschiedenen Möglichkeiten, vor allem in polyploiden Metaphasen, untersucht (GLÄSS 1957a). Dabei stellten wir fest, daß gewisse Sonderungen besonders häufig auftreten und in enger Verbindung mit der Ausbildung des komplexen Mitosemusters der Rattenleber stehen. Auch in den aneuploiden Mitosen ist eine Genomsonderung vorhanden.

Allerdings muß erst geklärt werden, ob der Ausdruck „Genom"-Sonderung auch bei den aneuploiden Metaphasen angewandt werden darf oder ob hier nicht der Begriff „Chromosomen"-Sonderung geeigneter ist. Dies wäre ernsthaft in Betracht zu ziehen, wenn die Sonderung in aneuploiden Metaphasen jegliche Form annähme und bei Metaphasen mit 54 Chromosomen z. B. die ganze Skala der Möglichkeiten von 1:53 bis 27:27 umfaßte. Wie sich aber in unserem Material zeigen läßt, haben wir es nur mit 3 Grundformen der Genomsonderung zu tun. Bei aneuploiden Metaphasen mit 54 Chromosomen z. B. finden sich unter den 27 verschiedenen Möglichkeiten einer Chromosomengruppierung bevorzugt die Sonderungen nach ganzen Genomen bzw. „Unter"-Genomen wie 42:12 und 21:21:12. Als weitere Form der Genomsonderung in aneuploiden Metaphasen treten Genomsonderungen auf, bei denen neben ganzen Chromosomensätzen noch eine Restchromosomengruppe vorhanden ist, die aus mehr als einem haploiden Genom be-

steht (z.B. 54 = 21:33 oder 69 = 21:33:15, s. Abb. 6). Als dritte Möglichkeit ergibt sich noch eine Trennung in rein aneuploide Chromosomengruppen (Abb. 5), und zwar treten dabei bestimmte Chromosomenzahlen gehäuft auf (z.B. 33 = 27:6); wir bezeichnen diese als Sonderfälle der Genomsonderung (vgl. Gläss 1957a).

In Tabelle 3 sind die gefundenen Genomsonderungen der verschiedenen aneuploiden Metaphasen zusammengestellt. In insgesamt 28 verschiedenen aneuploiden Chromosomenzahlen mit einem Metaphasenbestand von 297 Zellen treten nur 38 verschiedene Sonderungen auf, bei denen in der Regel nach ganzen Genomen plus einer aneuploiden Restchromosomengruppe gesondert wird. Bei diesen Restgruppen fällt auf, daß sie meist aus den Zahlen 6, 12, 27, 33 und 54 bestehen. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, treten Mitosen mit diesen Chromosomenzahlen (außer der Zahl 6) in der Rattenleber besonders zahlreich auf. Auch bei den Sonderfällen der Genomsonderung (s. Tabelle 3) finden sich ebenfalls die Zahlen 27 und 33. Allerdings haben wir nur 4 Metaphasen mit einer Trennung in rein aneuploide Chromosomengruppen beobachtet, und zwar 33 = 17:16, 33 = 27:6, 36 = 27:9, 60 = 33:27.

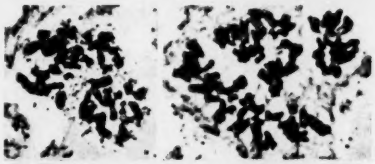

Abb. 5 Abb. 6

Abb. 5. Diploide Metaphase mit aneuploider Genomsonderung nach 27:15. 3000mal

Abb. 6. Aneuploide Metaphase (69 Chromosomen) mit aneuploider Genomsonderung nach 21:33:15. 3000mal

Die Häufigkeit der Genomsonderungen in den aneuploiden Metaphasen (Tabelle 3) läßt sich wegen des zu geringen Materialumfangs bei den übrigen Zahlen nur für die bevorzugten Zahlen 27, 33, 54 und 75 näher betrachten. Bei Metaphasen mit 27, 33 und 54 Chromosomen finden wir verhältnismäßig wenige Formen der Genomsonderung, während bei Metaphasen mit 75 Chromosomen 5 verschiedene Typen vorhanden sind. Bei Zellen mit 54 Chromosomen ist die Sonderung nach ganzen Genomen plus einer Restchromosomengruppe mit mehr als 21 Chromosomen (21:33) fast genau so stark vertreten wie die übrigen Genomsonderungen. Bei Zellen mit 75 Chromosomen ist diese Sonderung sogar besonders bevorzugt (42:33, 21:21:33, 21:54).

Wie bei den euploiden Metaphasen sind somit auch bei den aneuploiden Stadien nur einige wenige Genomsonderungen aus der Vielzahl der möglichen realisiert. Diese Typen enthalten neben ganzen Genomen aneuploide Restgruppen, deren Chromosomenzahl mit den bevorzugten Zahlen der aneuploiden Kerne übereinstimmt.

Tabelle 3. *Die Genomsonderung in den verschiedenen aneuploiden Metaphasen*

Chromosomenzahl	Anzahl der Metaphasen gesamt	Gefundene Sonderungen (Anzahlen in Klammern)			
12	7	12 (7)			
13	1	13 (1)			
16	2	16 (2)			
27	50	27 (46)	21:6 (3)	11:10:6 (1)	
33	85	33 (76)	21:12 (7)	27:6 (1)	17:16 (1)
35	2	35 (2)			
36	5	36 (2)	21:15 (2)	27:9 (1)	
37	1	37 (1)			
44	1		21:23 (1)		
48	3	48 (3)			
49			21:21:7 (1)		
50	7	50 (3)	21:21:8 (2)	21:29 (2)	
54	68	54 (41)	42:12 (10)	21:21:12 (9)	
			21:33 (8)		
57	1	57 (1)			
58	2	58 (2)			
60	2	60 (1)	33:27 (1)		
67	1		42:21:4 (1)		
69	11	69 (4)	42:21:6 (2)	42:27 (3)	
			21:21:27 (1)	21:33:15 (1)	
74	2	74 (1)	42:21:11 (1)		
75	28	75 (11)	63:12 (1)	42:21:12 (3)	42:33 (8)
			21:21:33 (3)	21:54 (2)	
78	1	78 (1)			
79	1		42:37 (1)		
90	4	90 (2)	42:42:6 (1)	42:21:27 (1)	
96	3		63:33 (1)	42:42:12 (1)	
			42:21:21:12 (1)		
98	1	98 (1)			
99	2	99 (1)	42:21:21:15 (1)		
117	3		84:33 (1)	63:27:27 (1)	
			42:42:33 (1)		
138	2		42:42:21:33 (1)	42:42:54 (1)	

VI. Die Abhängigkeit der Genomsonderung vom Alter und Ploidiegrad

Innerhalb einer Altersstufe sind wie bei den euploiden Kernen (GLÄSS 1957a) die Differenzen in der Anzahl der aneuploiden Metaphasen mit Genomsonderung sehr gering. Ebenso treten zwischen 12 Std und 6 Tage alten Tieren keine feststellbaren Differenzen auf; die Anzahl der Zellen mit Genomsonderung beträgt bei 12 Std alten Ratten 23%, bei 6 Tage alten Tieren 20%. Bei 6 Monate und 11 Monate alten, partiell hepatektomierten Tieren dagegen enthalten 49 bzw. 51% aller Zellen eine Genomsonderung; die Häufigkeit der aneuploiden Zellen mit Genomsonderung hat also gegenüber der der 6 Tage alten Tiere um mehr als das Doppelte zugenommen.

Eine verstärkte Hepatektomie scheint auf die Anzahl der aneuploiden Zellen mit Genomsonderung keinen Einfluß zu haben; der Anteil der

betreffenden Zellen liegt bei 44%, also sogar — wenn auch bei n = 38 ungesichert — niedriger als in normal hepatektomierten Tieren.

Um die Abhängigkeit der Genomsonderung vom Ploidiegrad festzustellen, ist die Anzahl der aneuploiden Metaphasen mit Genomsonderung innerhalb der einzelnen Altersstufen nicht groß genug. Fassen wir aber alle aneuploiden Metaphasen mit Genomsonderung zusammen und ordnen die einzelnen Mitosen der Ploidiestufe nach an, so stellen wir fest, daß mit steigendem Ploidiegrad die Anzahl der aneuploiden Metaphasen mit Genomsonderung zunimmt (Tabelle 4); offensichtlich ist also die Anzahl der aneuploiden Zellen mit Genomsonderung vom Ploidiegrad abhängig, wie dies auch bei den euploiden Teilungsstadien der Fall war.

Tabelle 4. *Die Abhängigkeit der Genomsonderung in aneuploiden Metaphasen vom Ploidiegrad*

Ploidiegrad und Chromosomenzahl	Metaphasen gesamt	Normal	Genomsonderung
1n = 11— 31	60	56	4
2n = 32— 52	105	82	23
3n = 53— 73	85	45	40
4n = 74— 94	36	15	21
5n = 95—115	6	2	4
6n = 116—136	3	0	3
7n = 137—157	2	0	2

Diskussion

I. Das Problem der Aneuploidie in der unbehandelten Rattenleber

Über Untersuchungen an der Rattenleber liegen Befunde von TANAKA (1953) vor, der in Embryonen 35% aneuploide Kerne findet und für erwachsene, 48 Std nach partieller Hepatektomie untersuchte Leber sogar 60% aneuploide Zellen angibt (vgl. auch MAKINO und TANAKA 1953). Die von uns gefundenen Werte in der Rattenleber liegen demgegenüber wesentlich niedriger (s. MARQUARDT und GLÄSS 1957a), doch stellen auch wir in der erwachsenen Leber 48 Std nach partieller Hepatektomie mehr aneuploide Mitosen fest als in der junger bzw. neugeborener Tiere. Was die Chromosomenzahlen anbelangt, so finden HSU und POMERAT (1953) in der Leber Schwankungen zwischen 36 und 49, MAKINO und TANAKA (1953) stellen in den Mitosen der Rattenleber 30—89 Chromosomen fest, und unsere Werte variieren sogar zwischen 12 und 138 Chromosomen (vgl. auch GLÄSS 1957b). Dies ist nicht verwunderlich, denn trotz aller Bemühungen und technischen Verbesserungen ist es bisher nur annähernd gelungen (TANAKA 1953, MAKINO und TANAKA 1953, OHNO und KINOSITA 1955, TJIO und LEVAN 1956), die normalen Ploidiestufen und Chromosomenzahlen in der auch von uns untersuchten Rattenleber zu ermitteln, da die Chromosomenmorphologie nur mangelhaft bekannt war. Erst durch die exakte Identifizierung der Einzelchromosomen im Karyotyp der Rattenleber (GLÄSS 1956) konnte die Chromosomenzahl aneuploider Metaphasen mit Sicherheit genau fest-

gestellt und dadurch ein Beitrag zu der heute sehr aktuellen Frage nach dem Umfang sowie der Gesetzmäßigkeit aneuploider Mitosen in Säugetierorganen geleistet werden.

Das Problem der Aneuploidie wird seit den ersten Chromosomenzählungen in tierischen Geweben diskutiert. Anfangs wurde den Befunden über das Vorkommen von Zellen mit aneuploiden Chromosomenzahlen (WIEMANN 1912/13, HANCE 1917, 1926, PAINTER 1926, KARPLUS 1930, KEMP 1930, KRALLINGR 1931, ANDRES und JIV 1936 u. a.) kaum Beachtung geschenkt, da man derartige Zellen auf fehlerhafte Auswertung, schlechte Technik und ungeeignetes Material zurückführte (s. z. B. KEMP 1930) und diese Befunde dem „Gesetz der Konstanz der Chromosomenzahlen" widersprachen. Nachdem aber in den letzten Jahren die Methoden durch Vorbehandlung der Gewebe mit hypotonischen Salzlösungen wesentlich verbessert (s. zitierte Literatur) und auch mit der Quetschpräparatetechnik gute Erfolge erzielt wurden (HSU und POMERAT 1953, MAKINO und HSU 1954, KINOSITA und OHNO 1954, OHNO und KINOSITA 1955, BEATTY 1956, FRITZ-NIGGLI 1956, GLÄSS 1956, MARQUARDT und GLÄSS 1957) häufen sich die Beobachtungen, in denen — unabhängig von der speziellen Methode — über eine zum Teil große Anzahl von Zellen mit aneuploiden Chromosomenzahlen in normalen tierischen Geweben berichtet wird (BIESELE 1944, MELANDER 1950, TIMONEN und THERMAN 1950, THERMAN und TIMONEN 1951, HSU 1952, HSU und POMERAT 1953, MAKINO und TANAKA 1953, TANAKA 1953, MAKINO und HSU 1954, MANNA 1954, 1955, VENGE 1956, MARQUARDT und GLÄSS 1957a, GLÄSS 1957b). Die Menge der Angaben über aneuploide Zellen führte dazu, daß sich über das Vorkommen von aneuploiden Chromosomenzahlen in normalen Geweben in neuerer Zeit zwei entgegengesetzte Meinungen gebildet haben. Die einen Forscher vertreten nach wie vor die Ansicht, die aneuploiden Zellen auf Mängel bei der Auswertung zurückzuführen bzw. als zufällige Abweichungen anzusehen (SACHS 1953, WALKER und BOOTHROYD 1954, HUNGERFORD 1955, SCHMIDTKE 1955, VENGE 1956), die anderen stehen auf dem Standpunkt, aneuploide Zellen als real vorhanden und als konstanten Bestandteil der Gewebe zu betrachten.

Unsere Untersuchungen bringen in die Kontroverse über die aneuploiden Chromosomenzahlen einen weiteren, allerdings neuen Aspekt: Fanden wir doch die aneuploiden Chromosomenzahlen nicht zufallsgemäß verteilt, sondern in ganz charakteristischer und gesetzmäßiger Weise angeordnet. Auf Grund dieser Beobachtung können in unserem Material die aneuploiden Chromosomenzahlen nicht als gelegentlich auftretende Zufallsprodukte angesehen werden. Die Befunde sprechen ferner dafür, daß in normalem tierischem Gewebe — vor allem der Rattenleber — eine je nach Organ und Alter der Tiere schwankende Anzahl von aneuploiden Chromosomenzahlen vorhanden ist (vgl. GLÄSS 1957a, MARQUARDT und GLÄSS 1957a). Diese Tatsache wirft aber eine ganze Menge von Problemen und Fragen auf, die sich bei der gefundenen Schwankungsbreite der aneuploiden Chromosomenzahlen vor allem mit deren Entstehung befassen. Die bisherigen Untersuchungen geben über diese Frage leider nur sehr geringe Auskunft. Die meisten Autoren stellen lediglich fest, daß aneuploide Zellen aufgefunden werden und daß sich deren Chromosomenzahlen um die entsprechend di- bzw. tetraploiden Stufen gruppieren. Ob die Aneuploidie in allen Säugetierorganen

in gleicher Weise vorhanden ist, welchen Einfluß das Alter oder die Hepatektomie haben und inwieweit zwischen den einzelnen Tieren Differenzen vorliegen, darüber ist nur Unzureichendes bekannt. Unsere gegenüber früheren wesentlich umfangreicheren Chromosomenzählungen zeigen, daß die Aneuploidie in allen Tieren verbreitet ist und daß die Zahl der Aneuploiden in gleichaltrigen Tieren nur geringfügig schwankt (s. Tabelle 2, vgl. MARQUARDT und GLÄSS 1957a). Entgegen den bisherigen Ergebnissen anderer Autoren, die eine Gruppierung der aneuploiden Mitosen um die entsprechenden euploiden Stufen feststellten, fanden wir eine in allen Tieren vorhandene Bevorzugung bestimmter Aneuploidzahlen, deren Entstehung sich aber nicht mehr in der oben erwähnten einfachen Art interpretieren läßt (vgl. GLÄSS 1957b). Auch heute noch wird angenommen, daß aneuploide Chromosomenzahlen durch Mitoseanomalien, vor allem Spindelstörungen in der Anaphase, zustande kommen, und eine umfangreiche Literatur über derartige Störungen zeigt die weite Verbreitung dieser Ansicht (s. zitierte Literatur). Wir haben uns damit bereits in einer früheren Veröffentlichung eingehend auseinandergesetzt (GLÄSS 1957a) und auch an Hand von Anaphasenuntersuchungen nachgewiesen (MARQUARDT und GLÄSS 1957a), daß Mitoseanomalien nur in einem geringen Prozentsatz an der Ausbildung aneuploider Zellen überhaupt beteiligt sein können.

II. Die Entstehung der aneuploiden Chromosomenzahlen in der unbehandelten Rattenleber

Zum Verständnis des Zustandekommens der von der polyploiden Reihe 2n—4n—8n abweichenden Chromosomenzahlen wurden bereits früher (GLÄSS 1957a) folgende Möglichkeiten angeführt:

1. In den Mitosen mit einer Sonderung der Chromosomen in Genome, in Untergenome oder in aneuploide Chromosomengruppen kann es zu einer multipolaren Spindelbildung kommen (s. GLÄSS 1957a und dort zitierte Literatur). In der Anaphase entstehen dann z.B. auf der einen Spindelseite 2 getrennte Pole, so daß auf dieser Spindelseite anstatt eines Tochterkernes 2 Tochterkerne gebildet werden, welche jeweils die gesonderten Chromosomengruppen enthalten. So kann in einer Metaphase mit 4n = 84 Chromosomen und einer Genomsonderung nach 63:21 z.B. eine tripolare Spindel ansetzen, wodurch neben einem tetraploiden Tochterkern ein Tochterkern mit 63 Chromosomen und ein weiterer mit 21 Chromosomen zustande kommt. Unter denselben Voraussetzungen entstehen aus einer diploiden Zelle mit Genomsonderung nach 33:9 neben einem diploiden Tochterkern 2 aneuploide Kerne mit 33 und 9 Chromosomen.

2. Auf Grund derselben Ausgangslage — Mitosen mit Genomsonderung — kann es statt zu einer multipolaren Spindel auch zu einer

Amitose kommen [nachgewiesen durch BENNIGHOFF (1928), STÄMMLER (1928), CLARA (1931), BRUES und MARBLE (1937), GRUNDMANN (1954) u. a.], welche ebenso wie bei der ersten Möglichkeit die gesonderten Chromosomengruppen auf Tochterkerne verteilt.

3. Im Gegensatz zu den Möglichkeiten 1 und 2, die auf einer Herabregulierung der Chromosomenzahl beruhen und für die entsprechende Beobachtungen vorliegen, könnte auch ein die Chromosomenzahl aufregulierender Mechanismus verantwortlich sein: Die Entstehung der vom Endomitosezyklus abweichenden Chromosomenzahlen durch partielle Endomitose (GLÄSS 1957a), einer Endomitose, die nur in einem, durch die Genomsonderung bereits abgesonderten Kernabschnitt vor sich geht, während die Chromosomen im übrigen Teil des Kernes ungeteilt bleiben.

Das hier vorliegende Material an aneuploiden Chromosomenzahlen erlaubt es, nachzuprüfen, ob mit diesen Mechanismen das Mitosemuster und die Verteilung der aneuploiden Mitosen auf bevorzugte und nichtbevorzugte Kernklassen erklärt werden kann. Dabei sind 2 verschiedene Vorgänge auseinanderzuhalten, die beide zu dem beobachteten Mitosemuster führen können:

1. Die Aneuploiden gehen unmittelbar aus den entsprechenden euploiden Genomsonderungsfällen hervor; die beobachtete Mitose ist dann die erste Mitose nach dem Zustandekommen des Kernes mit dieser Chromosomenzahl.

2. Es ist eine breite Serie verschieden euploider Kerne mit Genomsonderung vorhanden, aus der dann in Zusammenhang mit einer Teilung die verschiedensten aneuploiden Zahlen entstehen können; die beobachteten Mitosen sind der teilungsfähige Rest der ursprünglich vorhandenen Aneuploiden, die einem Selektionsvorgang unterworfen wurden.

Wenn nur der erste Vorgang am Zustandekommen der aneuploiden Chromosomenzahlen beteiligt ist, dann erhalten wir, wenn wir die durch Teilungsstörungen möglichen aneuploiden Zahlen (vgl. vorheriges Kapitel) außer acht lassen, eine vollständige Übereinstimmung zwischen den beobachteten Chromosomenzahlen in den Metaphasen mit Genomsonderung einerseits und den beobachteten aneuploiden Werten andererseits. Spielt dagegen auch der zweite Vorgang eine Rolle, dann fehlen als aneuploide Zahlen diejenigen, die zwar als Genomsonderung realisiert sind, aber durch mangelnde Teilungsfähigkeit nicht in die Mitose eintreten können.

Werten wir unter diesen Gesichtspunkten unser Material aus und addieren bzw. subtrahieren von den verschiedenen euploiden Stufen die aus den Sonderfällen der Genomsonderung und den aneuploiden Gruppen bevorzugt abgesonderten Chromosomenzahlen 6, 9, 12, 15, 16,

27, 30, 31, 33, 36, 54, so kommen wir zu den bevorzugten Aneuploiden (vgl. Tabelle 5)

durch Addition der Zahlen	12, 27, 33, 54
durch Subtraktion der Zahlen	9, 30, 36
durch Addition und Subtraktion der Zahlen	6, 15.

Tabelle 5. *Einige Möglichkeiten der Entstehung aneuploider Chromosomenzahlen*

21 — 6 = 15	42 — 6 = *36*	63 — 6 = 57	84 — 6 = *78*	105 — 6 = *99*
21 + 6 = **27**	42 + 6 = *48*	63 + 6 = *69*	84 + 6 = *90*	105 + 6 = 112
21 — 9 = **12**	42 — 9 = **33**	63 — 9 = **54**	84 — 9 = **75**	105 — 9 = *96*
21 + 9 = 30	42 + 9 = 51	63 + 9 = 72	84 + 9 = 93	105 + 9 = 114
21 — 12 = 9	42 — 12 = 30	63 — 12 = 51	84 — 12 = 72	105 — 12 = 93
21 + 12 = **33**	42 + 12 = **54**	63 + 12 = **75**	84 + 12 = *96*	105 + 12 = *117*
21 — 16 = 5	42 — 16 = 26	63 — 16 = 47	84 — 16 = 68	105 — 16 = 89
21 + 16 = 37	42 + 16 = 58	63 + 16 = 79	84 + 16 = 100	105 + 16 = 131

Keine der besetzten Aneuploidzahlen erhalten wir dagegen, wenn wir zu den euploiden Stufen die Zahlen 16 und 31 addieren oder subtrahieren, obwohl diese ebenfalls bevorzugt abgesondert werden (s. oben). Es ist wahrscheinlich, daß die daraus resultierenden aneuploiden Chromosomenzahlen (z. B. 42 + 16 = 58 oder 42 — 16 = 26) wohl entstanden sind, daß sie aber nicht teilungsfähig und daher gegenüber den anderen Zahlen im Selektionsnachteil sind.

Dasselbe Verhalten wie die Zahlen 16 und 31 zeigen die Untergenome, d. h. die Zahlen 11 und 10; weder durch Hinzufügen noch durch Wegnehmen dieser Werte von den euploiden Stufen oder auch von den Sonderfällen der Genomsonderung gelingt es, eine der auftretenden Aneuploidieklassen zu gewinnen. Da jedoch in 4% aller Fälle von Genomsonderung nach Untergenomen gesondert wird (GLÄSS 1957a), müssen auch derartige aneuploide Kerne zustande gekommen sein, sie sind aber wohl von der erwähnten Selektion als nicht weiter teilungsfähig ausgeschaltet worden.

In die gleiche Richtung weist auch die Differenz zwischen den theoretisch abgeleiteten bevorzugten Chromosomenzahlen und der in unserem Material beobachteten Anzahl. Obwohl z. B. die Aneuploidieklassen mit 30, 33 und 36 Chromosomen die gleiche Entstehungschance haben, finden wir unter den 297 aneuploiden Zellen keine mit 30 Chromosomen und nur 5 mit der Chromosomenzahl 36, dagegen 85 mit der Chromosomenzahl 33.

Die hier geschilderten Verhältnisse lassen unsere Frage nach dem Vorhandensein einer Selektion bei der Entstehung des Musters an aneuploiden Kernklassen folgendermaßen beantworten:

In den meisten Fällen ist der Zusammenhang zwischen der Genomsonderung und den aufgefundenen aneuploiden Zahlen so unmittelbar, daß ein Selektionsmechanismus nicht angenommen werden muß. An verschiedenen Stellen — bei der Sonderung in Untergenome und in Gruppen von 16 und 31 Chromosomen — müssen aber Selektionsvorgänge das Auftreten der entsprechenden Kernklassen im Mitosemuster verhindern.

Während wir bisher die Regelfälle betrachtet haben, dürfen wir dennoch nicht übersehen, daß auch einige aneuploide Zahlen vorhanden sind, die auf den bisher geschilderten Wegen nicht zustande gekommen sein können. Es ist dabei sehr wahrscheinlich, daß es sich um Chromosomenzahlen handelt, die durch Verteilungsstörungen der Mitose entstanden sind, um so mehr, als ja nach dem operativen Eingriff der Hepatektomie entsprechende Anomalien des Teilungsablaufes beobachtet wurden (vgl. GLÄSS 1957a, MARQUARDT und GLÄSS 1957a). Erstaunlicherweise spielen sie gegenüber den Regelfällen eine sehr untergeordnete Rolle (vgl. Tabelle 2); auch hier liegt der Schluß nahe, daß diese aneuploiden Chromosomenzahlen zwar ursprünglich häufiger vorhanden gewesen, aber als nicht teilungsfähig ausgeschieden worden sind.

Wenden wir uns nunmehr abschließend nochmals den besonders häufigen Aneuploidieklassen mit 27, 33, 54 und 75 Chromosomen zu, dann stoßen wir überraschenderweise auf eine einfache mathematische Beziehung: Diese Zahlen lassen sich von den benachbarten euploiden Stufen dadurch ableiten, daß wir dem euploiden Genom entweder eine oder zwei Sechsergruppen von Chromosomen hinzufügen ($21+6=27$, $21+12=33$, $42+12=54$, $63+12=75$). Prüfen wir nun alle aufgefundenen aneuploiden Chromosomenzahlen daraufhin durch, ob sie sich mit Hilfe von Sechser- bzw. Zwölfergruppen ableiten lassen, dann finden wir, daß nicht weniger als 89,6% unserer aneuploiden Mitosen dieser Regel folgen.

Es ist wenig wahrscheinlich, daß es sich dabei um einen Zufall handelt, um so mehr, als nach unseren Befunden diese Zahlen aus einer Lagebesonderheit im Zellkern, aus einer Genomsonderung, abzuleiten sind. Es erscheint uns daher der Schluß berechtigt, daß möglicherweise im Zellkern die einzelnen Chromosomen aus funktionellen Gründen nicht beliebig durcheinander liegen, sondern daß bestimmte gegenseitige Lagebeziehungen besondere Vorteile haben, etwa in den Fällen, in denen 6 oder 12 Chromosomen eine bestimmte Gruppe bilden. Leider waren wir bisher noch nicht in der Lage, bei den entsprechenden Metaphasen durch morphologische Identifikation der Einzelchromosomen nachzuweisen, daß es sich dabei stets um eine Gruppierung derselben 6 oder 12 Chromosomen-Individuen handelt. Indessen wird diese Hypothese gestützt durch die Chromosomenzahlen, die wir in hypohaploiden Mito-

sen finden. Zwar genügt das hier vorgelegte Zahlenmaterial noch nicht, aber mit Buttergelb behandelte Rattenlebern zeigen (GLÄSS unveröffentlicht), daß in erster Linie solche hypohaploiden Mitosen bevorzugt auftreten, deren Chromosomenzahlen eine oder mehrere Sechsergruppen enthalten, nämlich Metaphasen mit 6, 12 und 18 Chromosomen. Es sieht demnach so aus, als bildeten speziell diese Chromosomengruppen eine verhältnismäßig abgeschlossene „*Funktionsgruppe*", die gerade in einem hypohaploiden Kern eine volle Zellfunktion erlaubt. Ebenso müßte sich dann ein aneuploider Zellkern als besonders funktionstüchtig und damit teilungsfähig erweisen, der diese geschlossenen Funktionsgruppen zusätzlich zu einem kompletten Genom enthält. Wir werden in einer Arbeit über die Veränderungen des Mitosemusters nach Buttergelbbehandlung (GLÄSS unveröffentlicht, vgl. auch MARQUARDT und GLÄSS 1957 b) nochmals auf diese, für das Verständnis der Kernfunktion wohl nicht unwesentliche Hypothese der Funktionsgruppen von Chromosomen zurückkommen.

Zusammenfassung

1. In der Leber neugeborener, junger und erwachsener Ratten (letztere partiell hepatektomiert) wurde die Anzahl der aneuploiden Mitosen bestimmt, deren Chromosomenzahl festgestellt und der Einfluß des Alters und des Hepatektomiegrades auf die Ausbildung der aneuploiden Chromosomenzahlen untersucht. Auch das Phänomen der Genomsonderung wurde einer erneuten Überprüfung unterzogen.

2. Die Chromosomenzahlen der aneuploiden Zellen lassen sich nicht durch die Annahme von Teilungsstörungen euploider Kerne ableiten.

3. Die aneuploiden Chromosomenzahlen liegen bei 297 untersuchten Metaphasen (Mitosehäufigkeit 1:20000) zwischen 12 und 138, und zwar sind nur 28 Zahlen innerhalb dieser Grenze realisiert. Die Chromosomenzahlen 27, 33, 54 und 75 sind besonders bevorzugt; sie umfassen 77,8% aller aneuploiden Metaphasen.

4. Auch in aneuploiden Metaphasen tritt das Phänomen der Genomsonderung auf. In den meisten Fällen wird nach ganzen Genomen plus einer aneuploiden Restgruppe gesondert, deren Chromosomenzahl mit den bevorzugten Zahlen der aneuploiden Kerne (27, 33, 54, 75) übereinstimmt.

5. Unsere Befunde bestätigen die von uns bereits früher vertretene Auffassung, daß die aneuploiden Chromosomenzahlen der unbehandelten Rattenleber nicht ausschließlich durch Mitoseanomalien zustande kommen können, sondern im wesentlichen mit Hilfe der Genomsonderung. Die besondere Häufigkeit von Mitosen mit bevorzugten aneuploiden Chromosomenzahlen weist darauf hin, daß diese Funktionsgruppen von Chromosomen enthalten, die, zu einem kompletten Genom hinzugefügt, funktionstüchtige und teilungsfähige aneuploide Kerne garantieren.

Literatur

ANDRES, A., and B. V. JIV: Somatic chromosome complex of human embryos. Cytologia (Tokyo) **7**, 371—388 (1936).

BEATTY, R. A.: Chromosome constancy in the corneal epithelium of the mouse. Chromosoma (Berl.) **8**, 585—596 (1957).

BENNINGHOFF, A.: Zur Kenntnis und Bedeutung der Amitose und amitotischer Vorgänge. S.-B. Ges. Naturwiss. Marburg **1922**, 45—68.

BIESELE, I. I.: Chromosome complexing in regenerating rat liver. Cancer Res. **4**, 232—235 (1944).

BRUES, I. M., and B. B. MARBLE: An analysis of mitosis in liver restoration. J. exp. Med. **65**, 15 (1937).

CALLMANN, E.: Chromosome structure in the *Acrididae* with special reference to the X chromosome. Genetics **28**, 2—8 (1943).

CLARA, M.: Untersuchungen an der menschlichen Leber. II. Über die Kerngrößen in den Leberzellen. Z. mikr.-anat. Forsch. **22**, 145—219 (1925). — Über den Bau der Leber beim Kaninchen und die Regenerationserscheinungen an diesem Gewebe bei experimenteller Phosphorvergiftung. Z. mikr.-anat. Forsch. **26**, 45—172 (1931).

FRITZ-NIGGLI, H.: Die Chromosomen im menschlichen Mamma-Karzinom. Acta Union internat. Cancer **12**, 623—637 (1956).

GLÄSS, E.: Die Identifizierung der Chromosomen im Karyotyp der Rattenleber. Chromosoma (Berl.) **7**, 655—669 (1956). — Das Problem der Genomsonderung in den Mitosen unbehandelter Rattenleber. Chromosoma (Berl.) **8**, 468—492 (1957a). — Das Mitosemuster der unbehandelten Rattenleber nach Hepatektomie. Naturwissenschaften **44**, 639—640 (1957b).

GRUNDMANN, E.: Beiträge zur Krebsentstehung in der Rattenleber an Hand von mikrophotometrischen DNS-Messungen. Verh. dtsch. Ges. Path. (38. Tagg) **1954**, 362—370.

HANCE, R. T.: The diploid chromosome complexes of the pig and their variation. J. Morph. **30**, 155—222 (1917). — Sex and the chromosome in domestic fowl *(Gallus domesticus)*. J. Morph. **43**, 119—136 (1926).

HSU, T. C.: Mammalian chromosomes in vitro. I. The karyotype of man. J. Hered. **43**, 167—172 (1952).

—, and C. M. POMERAT: Mammalian chromosomes in vitro. II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue cultures. J. Hered. **44**, 23—29 (1953). III. On somatic aneuploidy. J. Morph. **93**, 301—319 (1953).

HUNGERFORD, D. A.: Chromosome numbers of ten-day fetal mouse cells. J. Morph. **97**, 497—509 (1955).

KARPLUS, H.: Ein Beitrag zur Kenntnis der somatischen Mitose beim Menschen. Z. Zellforsch. **10**, 38—52 (1930).

KEMP, T.: Über die somatischen Mitosen beim Menschen und warmblütigen Tieren unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Z. Zellforsch. **11**, 429—444 (1930).

KINOSITA, R., and S. OHNO: A morphological element found on rat chromosomes. Exp. Cell Res. **7**, 581—583 (1954).

KRALLINGER, H.: Cytologische Studien an einigen Haussäugetieren. Arch. Tierernähr. Tierz. **5**, 48—63 (1931).

LEVAN, A.: Chromosome studies on some human tumors and tissues of normal origin grown in vivo and in vitro at the Sloan-Kettering Institute. Cancer (Philad.) **9**, 648—663 (1956).

MAKINO, S., and E. MOMMA: Observation on the structure of grasshopper chromosomes subjected to an aceto-carmine treatment. J. Morph. **86**, 229—251 (1950).

—, and T. C. Hsu: Mammalian chromosomes in vitro. V. The somatic complement of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. Cytologia (Tokyo) **19**, 23—28 (1954).
—, and T. Tanaka: Chromosome features in the regenerating rat liver following partial exstirpation. Tex. Rep. Biol. Med. **11**, 588—592 (1953).
Manna, G. K.: Chromosome number of human cervix uteri. Nature (Lond.) **176**, 354—355 (1955). — Chromosome number of human endometrium. Nature (Lond.) **173**, 271—272 (1954).
Marquardt, H., u. E. Gläss: Die Chromosomenzahlen in den Leberzellen von Ratten verschiedenen Alters. Chromosoma (Berl.) **8**, 617—636 (1957a). — Die Veränderung der Häufigkeit euploider und aneuploider Chromosomenzahlen in der hepatektomierten Rattenleber nach Buttergelbverfütterung. Naturwiss. **44**, 640 (1957b).
Melander, Y.: Chromosome behaviour of a triploid adult rabbit as produced by Häggquist and Bana after colchicine treatment. Hereditas (Lund) **36**, 335—341 (1950).
Ohno, S., and R. Kinosita: The primary and secondary constrictions on the chromosomes of the rat lymphoblast. Exp. Cell Res. **8**, 558—562 (1955).
Painter, T. S.: Studies in mammalian spermatogenesis (The chromosomes of rabbit). J. Morph. **43**, 1—22 (1926).
Sachs, L.: Subdiploid chromosome variation in man and other mammals. Nature (Lond.) **170**, 205—206 (1953).
Schmidtke, C.: Über die Zahlenkonstanz der Chromosomen von Säugetieren. Berl. u. Münch. tierärztl. Wschr. **1955**, 411—422.
Stämmler, O.: Physiologische und pathologische Regeneration. Arch. klin. Chir. **153**, 550—570 (1928).
Tanaka, T.: A study of the somatic chromosomes of rats. Cytologia (Tokyo) **18**, 343—355 (1953).
Therman, E., and S. Timonen: Inconstancy of the human somatic chromosome complement. Hereditas (Lund) **37**, 266—279 (1951).
Timonen, S., and E. Therman: Variation of the somatic chromosome number in man. Nature (Lond.) **166**, 995—996 (1950).
Tjio, I. H., and A. Levan: Comparative idiogram analysis of the rat and the Yoshida rat sarcoma. Hereditas (Lund) **42**, 218—234 (1956).
Venge, O.: A simplified method of spreading the chromosomes in the rabbit blastocysts. Nature (Lond.) **174**, 608 (1954). — Chromosome number of rabbit blastocysts. Nature (Lond.) **177**, 384—385 (1956).
Walker, B. E., and E. R. Boothroyd: Chromosome numbers in somatic tissues of mouse and man. Genetics **39**, 210—219 (1954).
Wiemann, H.: Chromosomes in man. Amer. J. Anat. **14**, 461—471 (1912/13).

Dr. E. Gläss, Forstbotanisches Institut der Universität,
Freiburg i. Br., Bertholdstr. 17

Chromosoma (Berl.), Bd. 9, S. 286—291 (1958)

From the Botanical Museum of Harvard University, Cambridge, Mass.

ON THE ORIGIN OF ABNORMAL CHROMOSOME 10 IN MAIZE (ZEA MAYS L.) *

By

Y. C. TING

With 5 Figures in the Text

(Eingegangen am 16. Mai 1958)

Some years ago LONGLEY (1937) discovered, in certain strains of maize and teosinte from Mexico, an abnormal chromosome 10 which is characterized by an extra piece of pycnotic chromatin attached to the long arm of chromosome 10 and about equal to the length of the short arm of a normal chromosome 10. This piece bears, close to its distal end, a heterochromatic region which resembles a large chromosome knob. Other parts of the extra piece are similar to euchromatic regions in normal chromosomes in appearing to be differentiated into distinct chromomeres. This abnormal chromosome 10 has subsequently been found by MANGELSDORF and CAMERON (unpublished) in other varieties of maize from Mexico, Nicaragua, and Cuba, and by LONGLEY (1938) in varieties of maize from the United States.

RHOADES (1942) found that when maize plants are heterozygous for this abnormal chromosome 10, there is preferential segregation in the development of the megaspores, about 70% of the basal megaspores receiving the abnormal chromosome 10 instead of the 50% expected with random segregation. On the other hand, pollen grains carrying the abnormal chromosome 10 were at a disadvantage in competing with pollen possessing a normal chromosome 10, suggesting that this abnormal chromosome 10 has a deleterious effect upon pollen tube growth.

In another study RHOADES and VILKOMERSON (1942) found that secondary centric regions arise on more than one bivalent at metaphase I and on more than one dyad at metaphase II in the microsporocyte division in plants which are either homozygous or heterozygous for the abnormal chromosome 10. At anaphase I dyads with newly arisen centric regions tend to lead the way to the poles. At both metaphase and anaphase of the second meiotic division these secondary centric regions persist. The frequency is less for the formation of these secondary centric regions in plants heterozygous for the abnormal chromosome 10 than that in plants homozygous for the same chromosome.

* The present report was financed by a research grant from the National Science Foundation.

In a later study RHOADES (1952) suggested that the occurrence of neo-centromeres or secondary centric regions on chromosomes at both metaphase and anaphase divisions of maize sporocytes, heterozygous for the abnormal chromosome 10, may be responsible for preferential segregation of this chromosome.

LONGLEY (1945) confirmed the finding that preferential segregation for the abnormal chromosome 10 occurs in a plant heterozygous for this chromosome. In addition, he found that preferential segregation of the knobbed over the knobless type occurs in certain other chromosome pairs heterozygous for knobs.

Despite the interest of this chromosome to both cytologists and geneticists, its origin has so far not been traced.

Observations A

In the summer of 1956 a cytological study was made of a number of F_1 crosses of maize varieties collected from Latin America with inbred strains from the United States, in which MANGELSDORF (unpublished) had previously found high percentages of aborted pollen and in which chromosome irregularities were therefore suspected. Microsporocytes of a total of 46 plants were examined with acetocarmine squash technique.

At pachytene, B-chromosomes of the type previously studied by MCCLINTOCK (1933) and RANDOLPH (1928, 1941), varying from one to six in number, were seen in 25 plants from nine crosses. No B-chromosomes were found in 18 plants from six crosses. In one additional cross not included in the above categories, involving a Peruvian variety as one parent, a B-chromosome was found in two plants, while a third plant in the same progeny lacked the B-chromosome, but was heterozygous for an abnormal chromosome 10. This situation, although in no way statistically significant and perhaps nothing more than a coincidence, nevertheless suggested to the author that the abnormal chromosome 10 might be the product of some kind of interchange between A- and B-chromosomes. Accordingly the abnormal chromosome was studied in detail and compared in its features to the B-chromosome occurring in sister plants.

The abnormal chromosome 10 was longer than its partner by about one-fifth the length of the normal chromosome 10. The extra chromosome segment was attached to the distal end of the long arm. It consisted of four more or less distinct parts: terminating the segment was a short, apparently chromatic region. Next came a prominent heterochromatic part, resembling a large knob. Adjoining this was a second apparently chromatic region (Fig. 1). The region at the point of union was pycnotic and resembled a large chromomere. Often the distal

chromatic segment folded back, making the heterochromatic region appear to be a single terminal knob (Fig. 2).

This entire extra piece of chromatin attached to chromosome 10 resembled closely the terminal one third of the B-chromosome found in the two sister plants. The extra piece involved the pycnotic or knob-like region and its adjacent regions on both sides, including the terminal centromere. These B-chromosomes in turn resembled those described

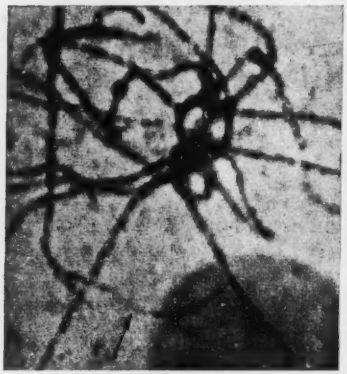

Fig. 1

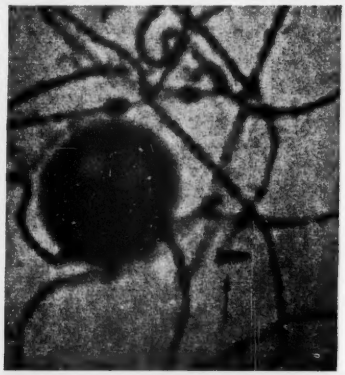

Fig. 2

Figs. 1—5. Photomicrographs of divisions in maize microsporocytes. Magnifications of all the figures are 1600 ×

Fig. 1. Heterozygous chromosome 10 at pachytene. The one with an extra piece of heterochromatin is an abnormal chromosome 10. Arrow points toward the chromatic region of the attached segment

Fig. 2. At the same division stage as Fig. 1 the attached segment folded back at the chromatic region and formed a terminal knob-like structure. Arrow points toward the heterochromatic region

by McClintock (1933), which she divided into the following regions: (1) terminal spindle fiber attachment region; (2) pycnotic region; (3) chromatic region composed of small, but distinct, chromomeres; (4) elongate pycnotic region with constrictions; (5) bulging pycnotic region; and (6) broken pycnotic region composed of four distinct parts. Because of the resemblance of the extra piece on the abnormal chromosome 10 to regions 1—4 of B-chromosomes it seems possible that a portion of the B-chromosome including the terminal spindle fiber attachment region was broken off and became attached to the end of the long arm of a chromosome 10 in some previous division. The point of breakage is at about four chromomeres removed from the pycnotic or knob-like region. After this event, the other portion of the B-chromosome was probably lost during subsequent divisions because it lacked a centromere. The entire study failed to find the other acentric portion of the B-chromosome.

ROMAN (1947) has reported reciprocal translocations between A- and B-type chromosomes. The transposition described here is a simple translocation between a B- and an A-chromosome.

Following pachytene there were some other striking features of chromosome configurations at different stages of microsporocyte divisions in the same plant. These features of chromosome configurations were different from those found in any microsporocytes homozygous for normal chromosome 10. These features are unorthodox.

At metaphase I secondary centric regions on more than one bivalent were observed in many sporocytes (Fig. 3). The number of these se-

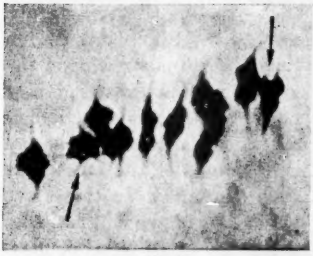

Fig. 3

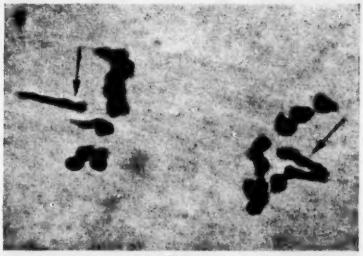

Fig. 4

Fig. 3. At metaphase I, secondary centric regions appeared on more than one bivalent. Arrows point toward the bivalents with newly formed centric regions.

Fig. 4. At anaphase II, attentuated monad and V-shaped monad (right) led the way of poleward movement. Arrows point to the monads

condary centric regions varied from one to four on a single bivalent. They were very clear in better prepared slides. The fiber-like structures which shot off from them were also apparent. At anaphase I the continuation of the appearance of the secondary centric regions was found. Dyads carrying one or more secondary centric regions tended to lead the way poleward in the anaphase chromosome movement, and it was obvious that these dyads reached the poles first. The other dyads which did not carry the secondary centric regions showed no aberrant configurations.

The unorthodox behavior of the chromosomes continued to the second meiotic division. At metaphase II the secondary centric regions on certain dyads showed precocious poleward movement while the primary centric regions oriented on the equatorial plane. The force of the movement of the secondary centric regions was so great that sometimes the arms of the dyads which manifested it were extensively attenuated. In contrast, the normal dyads never showed any irregular configuration. At anaphase II secondary centric regions often imparted a V-shaped configuration to the monads, with the primary centric regions lying toward the equatorial plane (Fig. 4). The manifestation of the secondary

centric regions may be related to the spindle attachment point located at the terminal region of the B-chromosome, and this spindle attachment point was often not apparent in the abnormal chromosome 10.

Observations B

In 1957, 12 additional plants of this same cross were studied cytologically with the following results: One plant was a heterozygote for an abnormal chromosome 10; it had no B-chromosome. One plant had a trivalent of B-chromosomes, while the other chromosomes were normal. These three B-chromosomes were always associated. Six plants had a single B-chromosome, and the remaining chromosomes in these plants were normal. The remaining four plants had an unusual chromosome 9, and lacked the B-chromosomes. In these four plants one of the chromosomes 9 had an extra piece of heterochromatin resembling the bulging pycnotic region of the regular B-chromosome, attached to the distal end of its short arm. At pachytene, this extra piece of heterochromatin appeared like a large terminal knob (Fig. 5). However, the remaining portion of the B-chromosome bearing the terminal spindle fiber attachment region was, by unknown mechanism, lost. Precocious movement of dyads and secondary centric regions on the bivalents, dyads, and monads at meiotic divisions were not found in the sporocytes possessing the unusual chromosome 9.

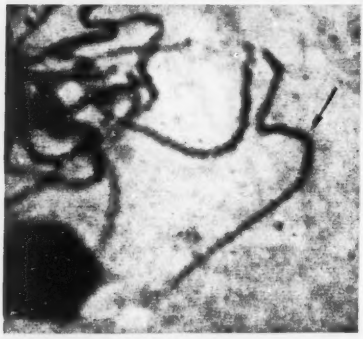

Fig. 5. At pachytene stage, chromosome 9, heterozygous for the attached piece of heterochromatin, is isolated. This extra piece of heterochromatin is like a terminal knob. Arrow points toward the centromere of chromosome 9

Summary

1. The abnormal chromosome 10 in maize, previously described by LONGLEY and by RHOADES, appears to be the product of a simple translocation between A- and B-chromosomes.

2. A similar change has also given rise to an abnormal chromosome 9, which has not been previously described. This abnormal chromosome 9 has a large piece of heterochromatin attached to the distal end of the short arm. This piece of heterochromatin sometimes appears like a large terminal knob.

Acknowledgments. The author is deeply indebted to Professor PAUL C. MANGELSDORF for providing the materials for this study and for his advice during the course of the work.

References

LONGLEY, A.E.: Morphological characters of teosinte chromosomes. J. agric. Res. **54**, 835—862 (1937). — Chromosomes of maize from North American Indians. J. agric. Res. **56**, 177 to 195 (1938). — Abnormal segregation during megasporogenesis in maize. Genetics **30**, 100 to 113 (1945).

MCCLINTOCK, BARBARA: The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meicsis in *Zea mays*. Z. Zellforsch. **19**, 191—237 (1933).

RANDOLPH, L.F.: Types of supernumerary chromosomes in maize (Abstr.). Anat. Rec. **41**, 102 (1928). — Genetic characteristics of the B-chromosomes in maize. Genetics **26**, 608—631 (1941).

RHOADES, M.M.: Preferential segregation in maize. Genetics **27**, 395—407 (1942). — Preferential segregation in maize. In: Heterosis, editor J.W. GOWEN, Ames, Iowa: Iowa State College Press 1952.

—, and H. VILKOMERSON: On the anaphase movement of chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **28**, 433—436 (1942).

ROMAN, H.: Mitotic nondisjunction in the case of interchanges involving the B-type chromosome in maize. Genetics **32**, 391—409 (1947).

Dr. Y.C. TING, Botanical Museum, Harvard University,
Oxford Street, Cambridge 38, Massachusetts, USA

Chromosoma (Berl.), Bd. 9, S. 292—304 (1958)

From the Botany School, Oxford, England

ADHESION LOCI IN THE DIFFERENTIATED HETEROCHROMATIN OF TRILLIUM SPECIES

By

G. W. Shaw

With 5 Figures in the Text

(Eingegangen am 31. Mai 1958)

1. Introduction

The chilled chromosomes of *Trillium* occasionally fail to part company in the usual way at anaphase. In certain regions of the H-segments, the chromatids appear to be fused. This may lead to the formation of bridges at telophase. This effect was attributed by Darlington and La Cour to the failure of certain genes to reproduce themselves, when their nucleic acid falls following cold treatment.

These authors described adhesions in three plants of *T. stylosum* and in two plants of *T. grandiflorum* but, as we have already pointed out (Darlington and Shaw 1958) these were all misnamed specimens of *T. recurvatum*, and hence the adhesions were confined to a single species examined by these workers. No further work on these points of attachment, which we will call *adhesion loci* has followed the original discovery, nor have any of the subsequent workers on *Trillium* mentioned the presence of such loci in their preparations.

A more detailed study of the frequency, nature and position of adhesion loci has been possible by a systematic examination of the preparations of 270 plants of *Trillium* used in our first study.

2. The structural basis of adhesions

Anaphase bridges have been found at mitosis in many organisms with and without treatments. They follow chemical treatment (Darlington and Koller 1947, Levan and Tjio 1948, D'Amato 1948, Darlington and McLeish 1951 etc.), or X-rays (Darlington and La Cour 1945, La Cour and Rutishauser 1954 etc.). They occur spontaneously in roots (Rees 1952), in pollen grains (Darlington and Upcott 1941) and in cancer cells (Koller 1947, Tjio and Levan 1953).

It now seems probable that most of these "point errors" are due to breakage and reunion in subchromatid units. The reunions may be of the straight or of the inverted kind (Darlington 1949, La Cour and Rutishauser 1954). Such subchromatid chiasmata lead to anaphase bridges, the mechanical breakage of which is usually asymetrical and often leads

to the formation of acentric fragments. The reunions following prophase X-raying may involve non-homologous loci, in which case a great variety of configurations can arise.

In contrast to the above features are those of the anaphase adhesions found after cold treatment of *Trillium* roots. Here the adhesions are weak, breaking at an early stage, presumably at the original point of adhesion. Never are non-homologous loci involved. The only other situation where the behaviour of anaphase bridges is comparable to those of those *Trillium* are

a) In the A chromosomes of an EHRLICH carcinoma tumour examined by TJIO and LEVAN (1954). Here the adhesions occur at the distal end of an achromatic segment (which might be a spontaneously starved H-segment), and its behaviour is identical with that of chilled *Trillium* H-segments, and

b) In the heterochromatic supernumerary chromosomes in the pollen grains of *Agropyron*, *Secale* etc. where the adhesion is presumably of a similar kind to that in the heterochromatic regions of *Trillium*.

3. The position and nomenclature of adhesion loci

Adhesion loci are found only in starved H-segments; they never occur in euchromatin, whether chilled or unchilled. There are two, possibly different, types of adhesion in *Trillium* — intercalary and terminal. Intercalary types may be present in intercalary or terminal segments. Terminal types are, of course resticted to terminal segments. The latter will be referred to as sister reunions (SR).

All adhesions found so far have been in proximal segments, i. e. those segments which are nearest to the centromere in any given chromosome arm. Adhesion are always at the distal end of this segment when it is close to the centromere. The only exception to this rule is in the short arm of chromosome D of *T. cernuum* where, in some plants a small intercalary H-segment is present. This never shows adhesions, these being confined to the long terminal segment in the same arm.

Within a segment adhesions may be proximal (p), median (m) or distal (d) in relation to the centromere (fig. 3). In describing an adhesion locus the name of the chromosome (A—E) will be followed by the arm (long — l or short — s) and the position of the adhesion within the segment (i. e., p, m, d or SR).

Chromosome A: completely free from adhesions, even in the two species (*T. erectum* and *T. cernuum*) which contain H-segments in this chromosome.

Chromosome B: of all the complement, the most susceptible to adhesion. Adhesion loci have been found in the short arm of this chromosome in all the six species which undergo adhesion. In *T. erectum* SR

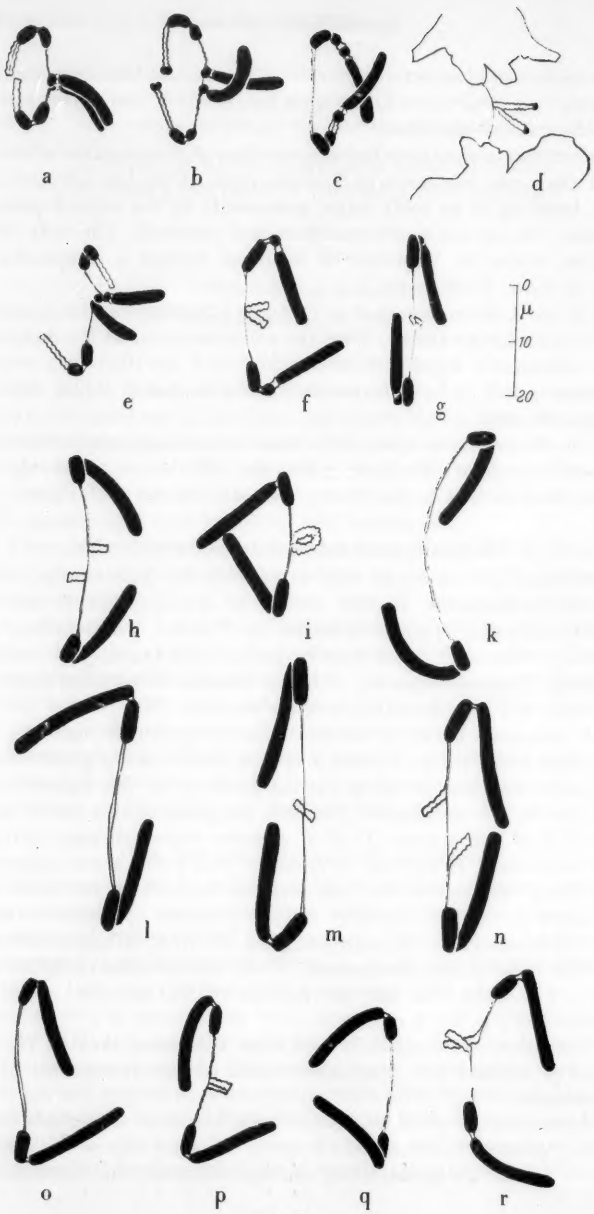

Fig. 1

has been found in the two plants with terminal H-segments. The other four plants had a small terminal euchromatic knob, and hence a very long intercalary H-segment. This segment was unique. A single case of a proximal adhesion locus in this arm has been discovered at telophase (B^sp) (fig. 1, d).

T. erectum also has two H-segment in the long arm of B, and of these, the proximal segment often undergoes adhesion at its distal end (B^ld). Chromosome B of *T. cernuum* is identical with that of *T. erectum* except that in my sample it never carries a terminal euchromatic knob on its short arm. In spite of this fact, SR has not been observed in this species. Two new adhesion loci appear in *T. cernuum*, i. e. one in a median position (B^sm) and one in a subterminal position (B^sd). As with *T. erectum*, the long arm segment also has adhesions (B^ld).

The short arm of chromosome B in both *T. luteum* and *T. sessile* carries a terminal H-segment which can adhere in either a median or a terminal position (B^sm or B^sSR). In different individuals of both species this segment shows several lengths and, in general, the locus B^sm is more frequent in long segments and B^sSR in short segments. In clone 8 of *T. sessile* (which is heterozygous for long and short segments) it could be seen that this rule applied in every case (fig. 1 o, p). Loci B^sm and B^sSR are both found in *T. recurvatum*. In *T. chloropetalum*, B^sm is present. In one plant, a subterminal one (B^sd) is present.

Chromosome C: an adhesion locus is found only in *T. luteum*. In this species, the H-segment in the long arm can appear in an extra long form, when it is twice its normal size (and twice the size of its homologues in other species). It is in this extra large segment, and here alone that adhesion occurs, at the distal end (C^ld). This effect has been found in three clones which possess the extra large segment, one of which (clone 28) being heterozygous for the large (C2) and the small (C1) forms of the segment shows the adhesions to be confined to C2.

Chromosome D: does not appear to adhere in *T. erectum*. In *T. cernuum*, both intercalary (D^sm) and terminal (D^sSR) loci are found. *T. luteum*, unlike the preceding species, has a large intercalary segment in the short arm of D, and this has a distal adhesion locus (D^sd) in 5% of the cells. The corresponding segment in T. *sessile* has not been found to adhere, but relatively few anaphases have been examined. In *T. recurvatum* and *T. chloropetalum*, both D^sm and D^sSR are present.

Chromosome E: has a distal adhesion locus in the proximal H-segment of the long arm in *T. erectum*, *T. cernuum*, *T. luteum and T. recurvatum.*

Fig. 1a—r. Adhesions in Chromosome B (×2000). a, b) B^ld in *T. erectum*. c) B^sSR in *T. erectum*. d) B^sp in *T. erectum*. e) B^ld in *T. cernuum*. f) B^sm in *T. cernuum*. g) B^sd in *T. cernuum*. h) B^sm in *T. recurvatum*. i) B^sm and B^sSR in *T. recurvatum*. k) B^sSR in *T. recurvatum*. l) B^sSR in *T. chloropetalum*. m) B^sd in *T. chloropetalum*. n) B^sm in *T. chloropetalum*. o) B^sSR in *T. sessile* (short H). p) B^sm in *T. sessile* (long H). q) B^sSR in *T. luteum* (short H). r) B^sm in *T. luteum* (long H)

Fig. 2. a—l. Adhesions in Chromosomes C, D and E. (×2000) a) C^1d in *T. luteum*. b) D^s d in *T. luteum*. c) D^sm in *T.recurvatum*. d) D^sm in *T. recurvatum*. e) D^sSR in *T. recurvatum*. f) D^sm in *T. chloropetalum*. g) D^sSR in *T. chloropetalum*. h) E^1d in *T. erectum*. i) E^1d in *T. cernuum*. k) E^1d in *T. recurvatum*. l) E^1d in *T. luteum*

Table 1. *The distribution of adhesions in 283 chilled and fully starved plants of Trillium and Paris*

Species	No. of plants examined at anaphase	No. of plants with adhesions	Species	No. of plants examined at anaphase	No. of plants with adhesions
Positive:			Negative:		
T. erectum . . .	70	7	*T. grandiflorum*	65	—
T. cernuum . .	45	7	*T. ovatum* . . .	1	—
T. luteum . . .	30	5	*T. stylosum* . .	20	—
T. sessile . . .	20	2	*T. undulatum* .	10	—
T. recurvatum[1]	11	6	*Paris polyphylla*	8	—
T. chloropetalum	3	2			
			Total:	283	29

[1] Including 10 plants examined by DARLINGTON and LA COUR under the heading of *T. stylosum* and *T. grandiflorum*.

The position and frequency of adhesion loci in six species are summarised in tables 2—7 and illustrated in figs. 1 and 2.

The distribution of adhesion loci in 283 plants representing 11 species is given in table 1.

Table 2. *Frequency of different adhesion loci at anaphase in T. erectum*

Clone	B^sSR	B^sp	B^1d	E^1d	Total Cells with Adhesions	Total Cells	Proportion of Cells with Adhesions
2 (B1. E1)	3	—	11	3	12	*118*	10%
11 & 19 (B2. E2)	—	1	4	2	7	*62*	11.3%
24 (B2. E1)	—	—	3	—	3	*63*	4.7%

Table 3. *Frequency of different adhesion loci at anaphase in T. cernuum*

Clone	B^sm	B^sd	B^1d	D^sm	D^sSR	E^1d	Total Cells with Adhesions	Total Cells	Proportion of Cells with Adhesions
3 (B1. D1. E2)	3	8	2	—	1	—	11	*28*	39%
5, 11, 15 (B2. D1. E1)	6	2	1	—	—	3	11	*107*	10%
6 (B1. D1. E1)	2	—	3	1	—	1	5	*49*	10%
14 (B1: 2, D1. E1)	1	1	—	—	—	2	4	*25*	16%
20 (B1. D1. E1: 2	1	—	1	—	2	2	4	*14*	28%

Table 4. *Frequency of different adhesion loci at anaphase in T. luteum*

Clone	B^sm	B^sSR	C^1d	D^sd	E^1d	Total Cells with Adhesions	Total Cells	Proportion of Cells with Adhesions
11 (B3. B4, C2, D2. E2)	1	4	3	—	—	8	*61*	13%
12, 13 (B3. B5. C1)	21	11	—	3	—	22	*136*	16%
26 (B3. C2. E1. E4)	15	16	22	6	1	31	*122*	25.4%
28 (B3. B4, C1. C2, E2. E3)	3	1	2	—	1	4	*21*	19%

Table 5. *Frequency of different adhesion loci at anaphase in T. sessile*

Clone	$B^s m$	$B^s SR$	Total Cells with Adhesions	Total Cells	Proportion of Cells with Adhesions
8, 9 (B3. B4)	14	4	17	*88*	**20%**

Table 6. *Frequency of different adhesion loci at anaphase in T. recurvatum*

Clone	$B^s m$	$B^s SR$	$D^s m$	$D^s SR$	$E^1 d$	Total Cells with Adhesions	Total Cells	Proportion of Cells with Adhesions
1 (ovules) . . .	10	2	5	3	1	18	*199*	**9.0%**
1 (roots) . . .	28	1	11	—	5	37	*376*	**9.9%**

Table 7. *Frequency of adhesion loci at anaphase in T. chloropetalum*

Clone	$B^s m$	$B^s d$	$B^s SR$	$D^s m$	$D^s SR$	Total Cells with Adhesions	Total Cells	Proportion of Cells with Adhesions
1a (ovules) . .	75	—	42	17	21	98	*756*	**13.0%**
1a (roots) . .	5	—	5	3	2	10	*58*	**17.0%**
1b (roots). . .	10	8	—	2	—	17	*96*	**17.7%**

4. Discussion

a) The occurrence of adhesion loci

Adhesion are evidently confined to certain species, to certain plants within the species, to specific segments in a plant, and to particular regions or even specific points within the segments. They would appear to be confined to six of the present 11 species which have been investigated.

The diagrams provided by DARLINGTON and LA COUR (1940) show their adhesions to be in positions similar to those in the present study of *T. recurvatum*. RUTISHAUSER and LA COUR (1956) have also illustrated several adhesions in their cold treated hybrid *Trillium* endosperms, in the expected positions, (e. g. fig. 3b, f, g, h). These they have scored as bridges dues to spontaneous breakage and reunion.

No other workers have reported the presence of adhesion loci in chilled *Trillium* chromosomes, although quite a number of plants of *T. erectum* have been examined (e. g. WILSON and BOOTHROYD 1941, 1944; BAILEY 1949, 1954 etc.). Nor have HAGA and KURABAYASHI (1953, 1954 etc.) in their extensive studies of the Japanese species of *Trillium* mentioned their presence. We must assume that they are absent from the latter group where the H-segments are all very short.

In some species of *Trillium* (e. g. *T. erectum*) adhesion loci may be present in several plants from one clone, and in others (e. g. *T. cernuum*, *T. luteum* and *T. sessile*) adhesion loci appear to be restricted to structurally related clones. It is clear from *T. erectum*, *T. cernuum* and *T. sessile* that not all plants in a given "clone" will contain adhesion loci, although these may be present in some individuals. This is probably to be taken to indicate that cytologically indistinguishable individuals are not necessarily of clonal origin. The evidence, as far as it goes, indicates that the behaviour is not conditional, i. e. a plant which shows adhesions at one

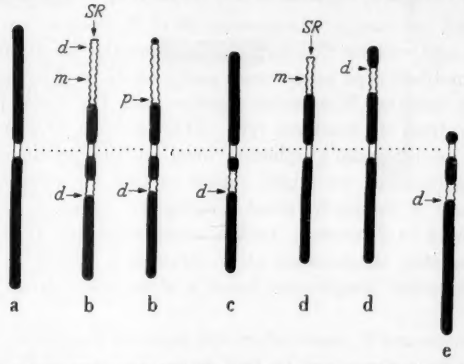

Fig. 3. Diagram of generalised *Trillium* chromosomes showing positions of known adhesion loci

time will reveal them in the same positions again if chilled and examined at a later date.

In no cases have single adhesion loci been detected in a plant. If adhesions are present at all, at least two, and usually several chromosomes in the complement possess the property simultaneously. Usually only one adhesion occurs in any one anaphase.

b) Position effect or damping effect?

There is a certain minimum length of heterochromatin necessary between the adhesion locus and the centromere before adhesions can take place. No segment less than this has been found to contain adhesions, although nearly all segments (in those individuals which are susceptible) which are longer than 1.5 μ contain adhesion loci. Similarly in only a single cell (clone 19 of *T. erectum* with B2) has an adhesion locus been found at the proximal end of an H-segment (B^sp). In every other clone, at least 1.5 μ of heterochromatin has separated the adhesion locus from the centromere.

Adhesions do not usually break until late anaphase. The H-segment proximal to the adhesion locus acts as a spring and uncoils, so reducing the pull of the centromere on the adhesion. In fact, the detection of most adhesions depends upon this uncoiling. A proximal adhesion would receive the full force of the centromere repulsions undamped by heterochromatin, and so would tend to break at an early stage. Whether this is the reason why proximal adhesions are not seen, further study will show.

c) Inversion, duplication and breakage of H-segments

As pointed out earlier, chromosome B of *T. erectum* can be of two forms, with and without the terminal euchromatic knob on the short arm. The knobbed type might most easily be derived by an inversion of the whole terminal H-segment together with the distal part of the euchromatin, from the knobless type. Thus in clone 19 with the single example of an intercalary adhesion locus at the proximal end of a knobbed chromosome, we might expect to find an adhesion locus at the distal end of its non-inverted homologue. Although this has not yet been found in *T. erectum*, such a locus is present at this point in the corresponding chromosome of *T. cernuum* a species in which the whole chromosome complement bears a close resemblance to that of *T. erectum*.

In *T. luteum* and *T. sessile* where the terminal H-segment on chromosome B exists in three and in four sizes, the smaller H-segments do not carry intercalary adhesion loci, but only terminal ones, i. e. SR. The large segments however may have a median or a terminal adhesion locus. It would thus appear that an intercalary locus can become terminal when the H-segment is shorter or a terminal adhesion locus give rise to a median one when it is longer. We might assume that the smaller has been derived from the larger or vice versa by breakage of SR bridges.

d) The nature of adhesions

When the adhering segments have parted company, a thin thread can often be seen to connect the original points of adhesion (fig. 1h, n, fig. 2d, k). This thread, which seems to be thinner than the unspiralised chromatid suggests that sub-chromatid units are involved. The thread does not persist, but breaks at an early stage of the anaphase movement. It is clearly the effective agent in delaying chromatid movement.

The X-ray work of La Cour and Rutishauser (1954) on *Scilla* endosperm has provided some evidence that inverted subchromatid reunion can take place, and is responsible for "point errors". Fig. 4 in their paper indicates that reunion of subchromatids, both proximal

and distal to the break has occurred, i. e. a genuine subchromatid chiasma has formed. If subchromatid breakage and reunion is responsible for the formation of adhesion loci in *Trillium*, we must assume that either less than half chromatid units are involved, or reunion is only partial, so leaving a weak link, which is almost invariably the point of breakage.

Probably reunion in terminal H-segments takes place in the subchromatid units only proximal to the break (fig. 4). Distal reunion alone might lead to the uncoiling of distal regions of the segment in subterminal adhesions, causing the crossover to in effect terminalise, and to leave behind an acentric fragment. It might also produce unequal subchromatid units within the same chromatid, and ultimately lead to unequal chromatids within a chromosome at the next mitosis. None of these abnormalities have been observed. The alternative of reunion in proximal units (fig. 4b) would seem to be a more satisfactory explanation. The broken subchromatids left at anaphase presumably rejoin in the telophase or interphase nucleus.

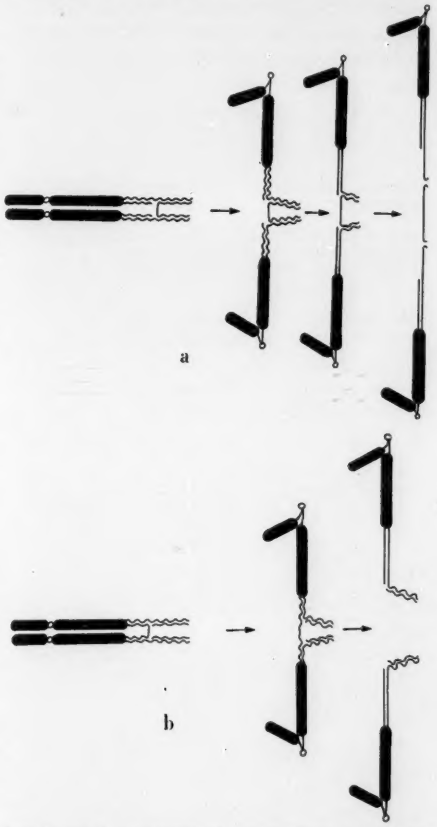

Fig. 4a and b. Hypothetical interpretation of partially reunited breaks in subchromatid units of *Trillium*. a Inverted distal reunions. b Inverted proximal reunions

Adhesion loci are at the proximal or the distal ends of intercalary H-segments. If reunion is partial, then this might take place either

proximal or distal to the break, so that four kinds of partial reunion are possible (fig. 5a—d).

Case (a) the reunited thread would probably break at early anaphase without detection. Case (b) might break without detection, or might terminalise at anaphase giving a very long thread between the chromatids. Either (c) or (d) could lead to the effect which is actually observed at anaphase.

We have already seen that in terminal H-segments, the reunion of subchromatids is probably at the proximal side of the break. This is very likely to apply to adhesions in intercalary segments.

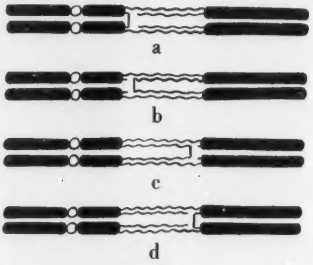

Fig. 5a—d. Possible forms of partial reunion in subchromatid units of intercalary H-segments. a Proximal reunion in proximal break. b Distal reunion in proximal break. c Proximal reunion in distal break. d Distal reunion in distal break

The specificity of the point of reunion might be a position effect governed by the centromere itself. It is known that adhesions due to X-rays do not occur in certain regions on each side of the centromere in *Vicia* and *Hyacinthus* the so called interference distance (cf. Davidson 1957). It might be that a distance of 1.5 μ in heterochromatin forms the interference distance for cold-induced adhesion loci. The heterochromatin itself is invariably separated from the centromere by at least 1 μ of euchromatin. Whether this has any effect on the position of adhesions within the heterochromatin is unknown.

SR might involve the fusion of two or four subchromatids, so giving two different strengths of adhesion. This is supported by the observations. SR usually breaks down at anaphase at the original point of adhesion. In a few cases, bridges persist until telophase, so connecting daughter nuclei.

Summary

1. After cold treatment, specific points in heterochromatic (H) segments stick together at anaphase. These have been called *adhesion loci*. They are constant in position within a given segment. Sister reunion (SR) of the ends of H-segments can also follow cold treatment.

2. SR sometimes persists into telophase, so forming a bridge between daughter nuclei.

3. Adhesion loci have been found only on *T. erectum*, *T. cernuum*, *T. luteum*, *T. sessile*, *T. recurvatum* and *T. chloropetalum*. They have

not been found in *T. grandiflorum*, *T. ovatum*, *T. stylosum*, *T. undulatum*, *Paris polyphylla* or any of the Japanese species of *Trillium*.

4. Adhesion loci are found in all chromosomes other than A. They do not occur in H-segments less than 1.5 μ in length.

5. Evidence is presented of inversion within the H-segments of *T. erectum* and *T. cernuum*.

6. Adhesions are probably due to subchromatid breakage followed by partial inverted reunion. Such reunions seem to be under the control of the centromere.

7. Spontaneous adhesions are probably not identical with those "point errors" which follow X-rays and chemical treatments.

Acknowledgment. I am indebted to Prof. C. D. DARLINGTON F. R. S. for advice and criticism during the course of this work.

References

BAILEY, P. C.: Differential chromosome segments in *Trillium erectum*. Bull. Torrey bot. Club **76**, 319—336 (1949).

D'AMATO, F.: The chromosome breaking activity of chemicals as studied by the *Allium cepa* test. Publ. Staz. zool. Napoli **22**, suppl., 158—170 (1950).

DARLINGTON, C. D.: The working units of heredity. Hereditas **6**. Suppl. 189—200 (1949). — Messages and movements in the cell. Conference on Chromosomes, Wageningen 1956.

—, and P. C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. Heredity **1**, 187—221 (1947).

—, and L. F. LA COUR: Nucleic acid starvation of the chromosomes in *Trillium*. J. Genet. **40**, 185—213 (1940). — Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. J. Genet. **46**, 180—267 (1945).

—, and J. MCLEISH: The action of Maleic hydrazide on the cell. Nature (Lond.) **167**, 407—408 (1951).

—, and G. W. SHAW: Parallel polymorphism in the heterochromatin of *Trillium* species. Heredity 1958 (in the press).

—, and M. B. UPCOTT: Spontaneous chromosome change. J. Genet. **41**, 297—338 (1941).

DAVIDSON, D.: The irradiation of dividing cells. 1. The effect of X-rays on prophase chromosomes. Chromosoma (Berl.) **9**, 39—60 (1957).

HAGA, T.: Genome and polyploidy in the genus *Trillium*. VI. Hybridisation and speciation by chromosome doubling in nature. Heredity **10**, 85—98 (1956).

—, and M. KURABAYASHI: Genome and polyploidy in the genus *Trillium*. VI. Genome analysis by means of differential reaction of chromosome segments to low temperature. Cytologia (Tokyo) **18**, 13—28 (1953). — V. Chromosomal variation in natural populations of *T. kamtschaticum*. Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ., Ser. E **1**, 159—185 (1954).

KOLLER, P. C.: Abnormal mitosis in tumours. Brit. J. Cancer **1**, 38—47 (1947).

LA COUR, L. F., and A. RUTISHAUSER: X-ray breakage experiments with endosperm. I. Subchromatid breakage. Chromosoma (Berl.) **6**, 696—709 (1954).

LEVAN, A.: The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the *Allium* test. Proc. 8. Intern. Congr. Genetics. Hereditas (Lund) Suppl. 325—337 (1949).

Levan, A., and J. H. Tjio: Induction of chromosome fragmentation by phenols. Hereditas (Lund) **36**, 455—464 (1948).

Rees, H.: Centromere control of chromosome splitting. Heredity **61**, Suppl., 235—245 (1952).

Rutishauser, A., and L. F. La Cour: Spontaneous chromosome breakage in hybrid endosperms. Chromosoma (Berl.) **8**, 317—340 (1956).

Tjio, J. H., and A. Levan: Chromosome analysis of three hyperdiploid ascites tumours of the mouse. Lunds Univ. Årsskr. N. F. **2**, **50**, 1—39 (1953).

Wilson, G. B., and E. R. Boothroyd: Studies of differential reactivity. 1. The rate and degree of differentiation in somatic chromosomes. Canad. J. Res. C **19**, 400—412 (1941). — Temperature induced differential contraction in the somatic chromosomes of *Trillium erectum* L. Canad. J. Res. C **22**, 105—119 (1944).

Dr. G. W. Shaw,
Lancing College, Sussex (England)

Chromosoma (Berl.), Bd. 9, S. 305—318 (1958)

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

DIE WIRKUNG VON RÖNTGENSTRAHLEN AUF KERNE MIT VERSCHIEDENER HETEROCHROMATISCHER KONSTITUTION*

Von

S. S. Bhattacharjya

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1958)

1. Einleitung

Die Entdeckung des Heterochromatins durch Heitz (1928a, b) hat die Zytologie sowohl an grundlegenden Erkenntnissen als auch an schwer lösbaren Problemen bereichert. Die wichtigste Eigenschaft, die dem Heterochromatin zukommt, ist ohne Zweifel die Heteropyknose. Davon ausgehend konnte Caspersson Hinweise auf die chemische Zusammensetzung heterochromatischer Teile erbringen, und Darlington und La Cour (1940) zeigten durch Temperaturexperimente, daß besondere Verhältnisse im Stoffwechsel der Thymonukleinsäure mit den heterochromatischen Segmenten verbunden sein können. Infolge der Schwierigkeit, das Heterochromatin naturgetreu zu fixieren, ist uns aber ein klarer Einblick in die Struktur heterochromatischer Chromosomen oder Chromosomensegmente noch immer versagt. Dasselbe betrifft unsere Einsichten in den Gen-Gehalt des Heterochromatins. Zwar dürfte die Auffassung von der völligen Genleere als überwunden gelten, doch trägt die Ansicht, in diesem Chromatin hätten Polygene (Mather 1944) ihren Sitz, mehr oder weniger hypothetischen Charakter.

Eu- und Heterochromatin scheinen sich auch bei den spontanen und induzierten Strukturveränderungen, die zu chromosomalen Mutanten führen, zu unterscheiden. Es wurde vielfach gezeigt, daß im Heterochromatin eine größere Bruchhäufigkeit bzw. erhöhte Fähigkeit zur Strukturänderung vorliegt (Bauer 1939, Kaufmann 1939, Prokofyeva-Belgovskaya und Khvostova 1939, Demerec 1940, Gottschalk 1951, McClintock 1951). Durch Prokofyeva-Belgovskaya und Khvotsova (1939) haben wir die eigentümliche Nachbarschaftswirkung von Hetero- und Euchromatin kennengelernt: das erstere überträgt seine Eigenschaften auf das benachbarte Euchromatin.

Die Frage, ob das Heterochromatin seine euchromatische Umgebung auch bruchempfindlicher macht, könnte dadurch geklärt werden, daß

* Auszug aus einer Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Philosophischen Fakultät der Albertus-Magnus-Universität zu Köln.

man chromosomale Aberrationen bei heterochromatisch-euchromatischen Chromosomen hinsichtlich der Lage der Bruchstellen genau analysiert. Bei pflanzlichen Objekten ist dieses Ziel nicht erreichbar, da eine derart exakte Analyse nicht möglich ist. Ein anderer, wenn auch weniger übersichtlicher Weg schien uns in der Analyse von Röntgenwirkungen auf die Chromosomen zweier Objekte gegeben, deren Chromosomen sich in der Einordnung des Heterochromatins zwischen das Euchromatin unterscheiden. Wir wählten hierzu *Impatiens Balsamina* und *Impatiens Sultani*, zwei *Impatiens*-Arten, auf deren unterschiedliche Chromatinmuster schon Heitz (1929) und Smith (1934) hingewiesen haben. Während *I. Balsamina* in jedem Chromosom nur ein kräftiges heterochromatisches Mittelstück zeigt, liegt das Heterochromatin bei *I. Sultani* in meist kleineren, aber zahlreicheren Stücken über das Chromosom verteilt. Die Analyse von röntgeninduzierten Chromosomenmutationen sollte klären, ob die unterschiedlichen Heterochromatinmuster beim Mutationsvorgang eine Rolle spielen.

2. Material und Methode

Orientierende Versuche an *Impatiens Balsamina*, *I. Sultani*, *I. glandulifera*, *I. capensis* und *I. Oliveri* hatten ergeben, daß *I. Balsamina* und *I. Sultani* für die in Aussicht genommenen Untersuchungen am geeignetsten waren. *I. Balsamina* stammte aus Kulturen von Prof. v. Wettstein; es handelte sich um eine weißblühende Linie. *I. Sultani* erhielt ich durch den Botanischen Garten der Stadt Köln. Beide Arten waren durch Stecklinge vermehrt. Die Untersuchungen sind an 2 Klonen durchgeführt. Auf diese Weise gelang es auch, fast das ganze Jahr hindurch Versuchsmaterial zur Hand zu haben.

Wir bestrahlten junge Blüten, deren Pollenmutterzellen sich im Stadium des *prämeiotischen Ruhekerns* befanden. Man hat dadurch den Vorteil, daß sich die bestrahlten Kerne in weitgehend gleichem Entwicklungsstadium befinden, eine Bedingung, die bei Bestrahlung von Wurzelspitzen nicht erfüllbar ist. In anderen Versuchen wurden auch Blüten bestrahlt, in deren Antheren bereits zweikernige Pollenkörner gebildet waren; hierbei erfolgte die Bestrahlung zum Zeitpunkt der Anthese. Der generative Kern befindet sich dabei in allen Pollenkörnern einheitlich im Stadium der Prophase.

Vor Bestrahlung von prämeiotischen Ruhekernen wurde der Blüte eine Anthere entnommen, um das Entwicklungsstadium der Pollenmutterzellen festzustellen. Solche vorsichtig geöffneten Blüten entwickeln sich normal weiter. Niemals wurden bereits bestrahlte Pflanzen zu einem weiteren Versuch herangezogen. Vor und nach der Bestrahlung wurden die Pflanzen im Gewächshaus gehalten. Die Bestrahlungsdosis betrug 25—800 r. Als Röntgengerät diente eine Müller-Röhre (100 kV, 5 mA, ungefiltert).

Die Metaphase I der Meiosis läuft normalerweise 60—64 Std nach Beendigung des Ruhekernstadiums ab. Je nach dem Grad der Bestrahlung ist der Ablauf gestört. Bei geringen Dosen (25—100 r) kann man ungefähr 70 Std nach Bestrahlung der Ruhekerne mit Metaphasestadien rechnen. Noch höhere Dosen vergrößern diesen Zeitraum bis 75 Std. Da die meisten Versuche mit 100 oder 200 r durchgeführt wurden, fixierten wir 64—72 Std nach der Bestrahlung.

Die Blüten wurden in Carnoy fixiert und nach 12 Std in 70%igen Alkohol übergeführt. Teilweise wendeten wir die Feulgen-Färbung an. Besser war jedoch

die Färbung mit Karmin-Essigsäure, wenn mit 0,1% Oxychinolin vorbehandelt worden war. Zur Untersuchung der Teilung des generativen Kerns im Pollenschlauch wurden die Pollenkörner auf 3%igem Agar, der 12% Laktose enthielt, ausgesät. Der Agar war hierzu in dünner Schicht auf Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet. Die Objektträger mit den ausgesäten Pollenkörnern verblieben, in einer Petrischale mit feuchtem Filtrierpapier eingeschlossen, im Thermostaten bei 20°. Die Metaphase der Pollenschlauchmitose trat 4—6 Std nach Kulturbeginn ein. Die Schläuche wurden daher 6 Std nach Beginn des Versuchs mit Karmin-Essigsäure gefärbt.

3. Ergebnisse der Versuche

a) Die Chromosomenlänge und das Volumen des Heterochromatins

Damit Aussagen über die Wirkung des Heterochromatins gemacht werden konnten, mußten die Chromosomen der verwendeten Arten

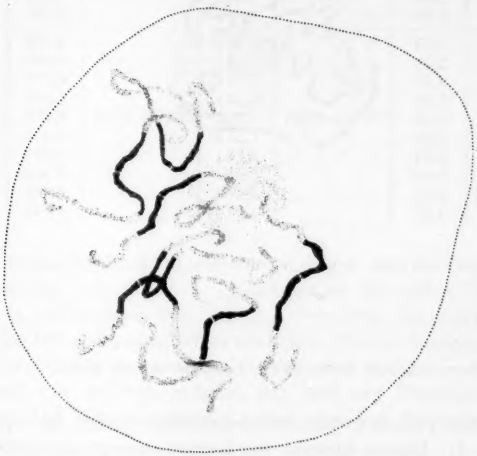

Abb. 1. Pachytän von *Impatiens Balsamina*. 1500 ×

zunächst im Pachytän gemessen werden. Die Längen der Chromosomen lassen auf das Volumen schließen, in dem die Röntgenstrahlen ihre Wirkung entfalten. In gut gelungenen Quetschpräparaten lassen sich die Chromosomen relativ leicht messen. Schwieriger ist es, innerhalb der Pachytänchromosomen den Anteil an Eu- und Heterochromatin festzulegen. Bei *I. Balsamina* (n = 7; Abb. 1) zeigen sich deutlich 7 heterochromatische Mittelstücke, deren Längen gut bestimmbar sind. Allerdings treten auch auf den euchromatischen Chromosomenteilen sehr kleine Stücke zutage, die sich zwar nicht so stark anfärben lassen wie die heterochromatischen Mittelstücke, aber doch eine etwas kräf-

tigere Tinktion als ihre Umgebung besitzen. Diese kleinen Chromatinstücke von durchschnittlicher Chromomerengröße wurden nicht zum Heterochromatin gerechnet, da im Ruhekern nur 14 Chromozentren sichtbar sind. Tabelle 1 zeigt, daß die *Balsamina*-Chromosomen bei durchschnittlicher Gesamtlänge von 204 μ aus 143 μ Euchromatin und 61 μ Heterochromatin bestehen. Bei *I. Sultani* (n = 8) sind die heterochromatischen Teile nicht nur in der Nähe des Zentromers lokalisiert,

Abb. 2. Pachytän von *Impatiens Sultani*. 1500×

sondern auch zwischen den euchromatischen Teilen der Schenkel verteilt (Abb. 2). Unsere Analyse war hierbei naturgemäß nicht fehlerfrei. Während wir bei den *Balsamina*-Chromosomen die sehr kleinen, stärker färbbaren Teile dem Euchromatin zurechnen müssen, können wir bei *I. Sultani* nicht mit der gleichen Sicherheit entscheiden, welche färbbaren Teile in dem Sinne sicher heterochromatisch sind, als nur sie den Chromozentren des Ruhekerns entsprechen. Die Zahl der stark färbbaren *I. Sultani*-Stücke beträgt im Pachytän häufig 28 (Abb. 2). Dies entspricht etwa den 50 im Ruhekern gefundenen Chromozentren. Die kleinsten Heterochromatinstücke haben bei *I. Sultani* eine Länge von 1 μ. Die größten reichen bis 6 μ. Die heterochromatischen Mittelstücke der *Balsamina*-Chromosomen reichen dagegen bis 10 μ. Die Gesamtlänge der *I. Sultani*-Chromosomen von 267 μ setzt sich aus 180 μ Euchromatin und 87 μ Heterochromatin zusammen.

Tabelle 1. *Länge der Pachytänchromosomen von I. Balsamina (n=7) und I. Sultani (n=8) in Mikron.* (Die Fehler bezeichnen das einfache m)

	Gesamtlänge der Chromosomen		Gesamtlänge des Euchromatins		Gesamtlänge des Heterochromatins	
	Einzelmessungen	Durchschnitt	Einzelmessungen	Durchschnitt	Einzelmessungen	Durchschnitt
I. Balsamina	180,8 234,2 197,5 227,3 171,2 216,7 181,5 231,2 213,1 189,4	204,3 ± 8,15	124,5 165,6 137,3 156,9 120,4 153,7 129,3 162,4 150,8 131,2	143,2 ± 5,63	56,3 68,6 60,2 70,4 50,8 63,0 52,2 68,8 62,3 58,2	61,1 ± 2,61
I. Sultani	233,6 294,2 271,5 258,5 294,6 270,8 248,6 284,2 268,6 246,8	267,1 ± 7,56	156,0 198,0 178,1 175,9 196,8 178,2 170,4 188,4 187,3 174,4	180,5 ± 5,17	77,6 96,2 93,4 82,6 97,8 92,6 78,2 95,8 81,3 72,4	86,6 ± 5,17

Die Ergebnisse der Pachytänmessungen zeigen, daß die Gesamtlänge der Chromosomen von *I. Sultani* größer ist als die von *I. Balsamina* (1,34:1). Die euchromatischen Längen verhalten sich entsprechend wie 1,26:1, die heterochromatischen wie 1,4:1. Da die Messungen selbst mit Fehlern verbunden sind und die Identifikation des Heterochromatins von *I. Sultani* nur teilweise möglich ist, darf den Unterschieden im Anteil an Eu- und Heterochromatin keine besondere Bedeutung beigemessen werden.

Die Unsicherheit im Erkennen des Heterochromatins während des Pachytäns veranlaßte dazu, eine Messung des Heterochromatins dort vorzunehmen, wo es sich vom Euchromatin scharf unterscheiden läßt. Dazu schien es *angebracht, die Chromozentren der prämeiotischen Ruhekerne beider Arten zu beobachten* und zu messen. Bei *I. Balsamina* erschienen 14 gut abgrenzbare Chromozentren, die ungefähr in der Mitte etwas eingeschnürt sind (Abb. 3). Sie wurden als zylinderförmige Körper betrachtet und entsprechend berechnet. Nachdem sie mit dem Zeichenapparat gezeichnet und die Bilder noch einmal auf das 3fache vergrößert waren, wurden Länge und Breite bestimmt. Im Durchschnitt enthielt *I. Balsamina* 10,11 ($\pm$ 1,23) μ^3 Heterochromatin. Schwieriger ist es, bei *I. Sultani* das Chromozentrenvolumen zu bestimmen. Im

Ruhekern findet man dort 48—55 stark färbbare Körper verschiedener Gestalt (Abb. 4). Sofern sie ziemlich kreisrund erschienen, wurden sie

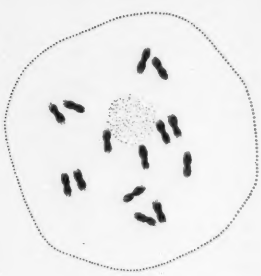

Abb. 3

Abb. 4

Abb. 3 und 4. Prämeiotische Ruhekerne von *Impatiens Balsamina* (Abb. 3); von *Impatiens Sultani* (Abb. 4). 1000×

als Kugeln aufgefaßt. Ellipsoidisch geformte Chromozentren wurden als Zylinder betrachtet und entsprechend berechnet. Bei Chromozentren, deren Umrisse unregelmäßig gestaltet waren, wurde eine Aufteilung vorgenommen; 2 oder 3 ziemlich zylindrische Teilstücke ermöglichten dann annähernd eine Berechnung des Volumens. Für *I. Sultani* wurde so ein Gesamtvolumen des Heterochromatins ermittelt, das sich von dem des *Impatiens Balsamina* praktisch nicht unterscheidet (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2. *Gesamtvolumen des Heterochromatins im prämeiotischen Ruhekern von I. Balsamina und I. Sultani*

	I. Balsamina	*I. Sultani*
Einzelmessungen (μ^3)	11,60	10,76
	10,18	12,58
	10,32	10,96
	8,87	8,82
	11,47	9,64
	9,71	12,88
	11,02	10,65
	9,10	8,12
	9,92	10,80
	8,88	12,08
Summe	101,07	107,29
Durchschnittliches Gesamtvolumen (μ^3)	$10{,}11 \pm 1{,}23$	$10{,}73 \pm 1{,}76$

b) Die Analyse der Röntgenwirkungen

Nach einigen Vorversuchen wurden die Röntgenwirkungen in den Monaten Mai bis Oktober 1953 und März/April 1954 untersucht. Die Tabelle 3 gibt darüber Auskunft, wie viele Blüten bei den 2 *Impatiens*-Arten mit den verschiedenen Röntgen-Dosen behandelt und wie viele davon untersucht wurden.

Die Zahl der bestrahlten Blüten ist deswegen größer als die der untersuchten, weil ein Teil von ihnen bei der Feststellung des Entwicklungszustandes kurz vor der Bestrahlung so stark beschädigt wurde, daß sie in die Analyse nicht einbezogen werden konnten.

Tabelle 3. *Zahl der bestrahlten und der untersuchten Blüten*

Dosis r	*I. Balsamina*		*I. Sultani*	
	bestrahlte Blüten	untersuchte Blüten	bestrahlte Blüten	untersuchte Blüten
25	56	43	38	29
50	40	31	37	30
100	119	94	131	103
200	122	95	125	95
300	115	86	99	79
500	61	51	59	45
800	38	28	51	40

Die Wirkungen, welche bereits in den ersten Stunden nach der Bestrahlung aufzufinden sind, faßt man am besten als „*Primäreffekte*" zusammen. Verklebungen Nichthomologer, Bildung von Pseudobivalenten, Störung der normalen Spiralisation bei allen Chromosomenpaaren oder auch nur bei einzelnen, Ausfall der Spindel und vollständige Hemmung der Entwicklung in der Prophase sind die wichtigsten von ihnen. MARQUARDT (1938) hat diese Anomalien eingehend beschrieben. Es dürfte sich um physiologische Effekte handeln, wobei die Schädigungen der Matrix und der Bewegungszentren vorherrschen. Die Primäreffekte nehmen mit steigender Dosis zu. Allgemein klingen sie mit fortschreitendem Intervall vom Zeitpunkt der Bestrahlung ab. Quantitativ sind sie nicht erfaßbar. Da wir die Abhängigkeit der Strahlungswirkung von der Heterochromatinverteilung quantitativ erfassen wollten, mußten wir versuchen, die *Sekundäreffekte* zahlenmäßig aufzunehmen. Sie kommen durch Brüche der Chromosomen und Chromatiden mit anschließender Fragmentbildung, Inversion, Translokation und Ringbildung zustande. Allerdings kann man die Entstehungsweise vieler Chromosomenmutanten, die in der Metaphase oder Anaphase der Meiosis I zu beobachten sind, nicht eindeutig klären, da die Chiasmabildung, die zwischen der Bruchentstehung im Ruhekern und der Metaphase stattfindet, zu Komplikationen führt.

Nach dem Gesagten war die quantitative Erfassung der Chromosomen-Aberrationen durch 2 Umstände eingeschränkt. Die Primäreffekte verhinderten eine Analyse nach Anwendung von Dosen oberhalb 300 r, da die Primäreffekte bei solchen Dosen bis in die Meta- und Anaphase von Meiosis I hineinreichen und eine eindeutige Beobachtung unmöglich machen. Sodann mußte die Analyse auf zwei Chromosomen-Anomalien beschränkt bleiben, deren Deutung unzweifelhaft war. Deshalb zählten

wir in der Metaphase I nur die Chromosomenfragmente und die reziproken Translokationen aus. Die ersten gehen auf einen einfachen Chromosomenbruch zurück, die zweiten verdanken ihre Entstehung einem Zwei-Bruch-Ereignis und sind an Viererkonfigurationen erkennbar (Abb. 5—7). In der Anaphase I erfaßten wir Fragmente und Brückenbildungen (Abb. 8). Letztere sind entweder auf einen Austausch von

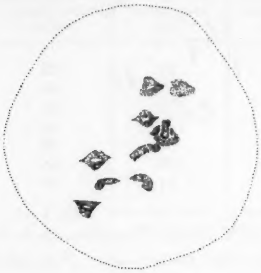

Abb. 5

Abb. 6

Abb. 7

Abb. 8

Abb. 5—7. Metaphasen I von *Impatiens Sultani*. Abb. 5 unbestrahlt; Abb. 6 nach Bestrahlung, ein Fragment; Abb. 7 bestrahlt, 6 Bivalente + 1 Viererkette. 1000×
Abb. 8. Anaphase I von *Impatiens Sultani*, bestrahlt, Brückenbildung. 1000×

zentromerenhaltigen Chromosomenstücken oder auf eine Inversion mit folgender Chiasmabildung zurückzuführen. In der Anaphase II wurden ebenfalls nur Brücken und Fragmente erfaßt. Die so charakterisierte Analyse stellten wir an Blüten von *I. Balsamina* und *I. Sultani* an, welche mit Dosen von 100, 200 oder 300 r bestrahlt waren. Nach Applikation von 25 und 50 r lag eine so geringe Zahl von Chromosomen-Aberrationen vor, daß die Untersuchung bei diesen Dosen nicht lohnenswert erschien.

Die Befunde sind in 3 Gruppen eingeteilt. Sie betreffen die Analyse der Metaphase I, Anaphase I und Anaphase II. In den Tabellen 4—6

Tabelle 4. *Analyse der Metaphase I von I. Balsamina und I. Sultani nach Bestrahlung des prämeiotischen Ruhekerns* (vgl. Text)

	Dosis r	Analysierte Zellen	Fragmente	F/Chr-Z	F/Chr-L	Reziproke Translokation	T/Chr-Z	T/Chr-L
I. Balsamina	100	607	21	24,7	1,7	30	35,3	2,4
I. Sultani	100	664	31	29.1	1,7	50	47,4	2,8
I. Balsamina	200	577	38	47,0	3,2	79	97,7	6,7
I. Sultani	200	642	64	62,3	3,7	117	113,9	6,9
I. Balsamina	300	413	32	55,3	3,8	72	124,5	8,5
I. Sultani	300	451	51	70,6	4,2	104	144,1	8,6

Tabelle 5. *Analyse der Anaphase I von I. Balsamina und I. Sultani nach Bestrahlung des prämeiotischen Ruhekerns*

	Dosis r	Analysierte Zellen	Fragmente	F/Chr-Z	F/Chr-L	Brücken	B/Chr-Z	B/Chr-L
I. Balsamina	100	167	17	72,7	5,0	11	47,1	3,2
I. Sultani	100	164	22	83,8	5,0	16	60,9	3,7
I. Balsamina	200	171	26	108,6	7,4	21	87,7	6,0
I. Sultani	200	176	35	124,2	7,4	29	117,1	6,2
I. Balsamina	300	121	25	147,5	10,1	23	135,7	9,4
I. Sultani	300	178	53	186,0	11,1	34	119,3	7,2

Tabelle 6. *Analyse der Anaphase II von I. Balsamina und I. Sultani nach Bestrahlung des prämeiotischen Ruhekerns*

	Dosis r	Analysierte Zellen	Fragmente	F/Chr-Z	F/Chr-L	Brücken	B/Chr-Z	B/Chr-L
I. Balsamina	100	109	27	76,9	12,1	10	65,5	4,5
I. Sultani	100	135	36	166,6	10,0	17	78,7	4,7
I. Balsamina	200	93	36	276,4	18,9	18	138,2	9,5
I. Sultani	200	83	40	301,2	18,0	21	158,1	9,5

sind jeweils die absoluten Werte der aufgefundenen Fragmente, reziproken Translokationen und Brückenbildungen angeführt. Die absoluten Zahlen wurden einerseits auf ein Chromosom bezogen, *andererseits auf 1 μ der Pachytän-Chromosomenlänge*. Die so erhaltenen Werte wurden jeweils mit 10^4 multipliziert. So bedeutet z. B. F/Chr-Z die Anzahl der gefundenen Fragmente pro 1 Chromosom $\times 10^4$. F/Chr-L bedeutet die Anzahl der Fragmente pro 1 μ Pachytän-Chromosomenlänge $\times 10^4$. Entsprechendes gilt für die Angaben der Translokationen (T) und der Brücken (B).

Eine letzte Serie von Bestrahlungen und vergleichenden Analysen der entstandenen Aberrationen wurde an reifen Pollenkörnern bzw.

Pollenschlauchmitosen vorgenommen. Die Bestrahlung traf hierbei das Prophasestadium. Die Untersuchung erfolgte an solchen Pollenschläuchen, deren generativer Kern die Metaphase durchmachte. Infolge der engen Lagerung der Chromosomen konnten Translokationen nicht mit Sicherheit erkannt werden. Daher blieb die Auszählung auf die Fragmente beschränkt. Sie sind in der Metaphase der Pollenschlauchmitose besonders deutlich zu erkennen (Abb. 9), da sie häufig aus dem Raum der Metaphase-Chromosomen seitlich herausrücken bzw. herausgedrängt werden. Die Bestrahlungsdosis betrug 25, 50 oder 100 r. Die Tabelle 7 faßt die Befunde zusammen. Den auf die Chromosomenzahl bezogenen F-Werten liegen die haploiden Chromosomenzahlen beider Arten zugrunde. Ebenso beziehen sich die F/Chr-L-Werte auf die halben Längenwerte der Pachytänchromosomen.

Abb. 9. Metaphase der Pollenschlauchmitose, links von *I. Balsamina*, rechts von *I. Sultani*, jeweils 2 Chromosomenfragmente sichtbar. 1000×

Tabelle 7. *Analyse der Metaphase bei der Teilung des generativen Kerns*

	Dosis r	Analysierte Pollenschläuche	Fragmente	F/Chr-Z	F/Chr-L
I. Balsamina	25	284	16	80,4	1,4
I. Sultani	25	244	21	107,5	1,6
I. Balsamina	50	275	24	124,6	2,1
I. Sultani	50	228	28	153,5	2,3
I. Balsamina	100	161	19	168,5	2,9
I. Sultani	100	141	23	203,9	3,1

Diskussion

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen besteht in der Feststellung, daß die Chromosomen von *Impatiens Sultani* in der Regel höhere Aberrationswerte aufweisen als die von *I. Balsamina*. Dabei erscheint es sinnvoll, die jeweiligen L-Werte zu vergleichen, bei denen die festgestellte Anzahl an Chromosomenbrüchen, -Translokationen oder -Brücken auf 1 μ Chromosomenlänge bezogen wurden. 19 Doppelversuchsreihen lassen einen exakten Vergleich zu. Unter ihnen zeigen 12 bei *I. Sultani* höhere Werte, 4 haben das gleiche Ergebnis, in 3 liegen höhere Werte bei *I. Balsamina* vor. Nachdem 2 grundlegende Voraussetzungen für die Vergleichbarkeit dieser Versuchsreihen gegeben waren, nämlich die Bestrahlung der Kerne beider Arten im gleichen Entwicklungsstadium und unter gleichen Außenbedingungen, scheinen Überlegungen gerechtfertigt, welche Faktoren wohl für die höhere Aberrationshäufigkeit von *I. Sultani* verantwortlich gemacht werden könnten. Dabei lassen wir zunächst außer acht, ob die Unterschiede auf einer erhöhten Bruchzahl oder einer geringeren Fähigkeit zur Wiederverheilung von *I. Sultani* beruhen.

Zunächst sei darauf hingewiesen, daß die verschiedenen Bestrahlungserfolge durch die genetischen Unterschiede zwischen den beiden *Impatiens*-Arten, also die gewiß zahlreichen Strukturunterschiede in den Kernen und Plasmen von *Impatiens Balsamina* und *I. Sultani*, hervorgerufen sein könnten. Die Differenzen im Heterochromatinmuster machen wohl nur einen Teil davon aus. Aus diesem Grunde kann unseren Überlegungen von vornherein nur eine eingeschränkte Gültigkeit zukommen. Der auffälligste Unterschied zwischen den Kernen der beiden *Impatiens*-Arten beruht allerdings auf der Anordnung des Heterochromatins. Den 14 Chromozentren des Ruhekerns von *I. Balsamina* stehen etwa 50 von vielfach kleinerer Größe bei *I. Sultani* gegenüber. Die Massen des Heterochromatins der beiden Spezies darf man als gleich bezeichnen, wenn man als Heterochromatin nur das heteropyknotische Chromatin, das im Ruhekern hervortritt, gelten läßt. Da die Ruhekerne bestrahlt wurden, sind die Verhältnisse dieses Stadiums in erster Linie maßgebend für die Beurteilung der Strahlenwirkung.

Wir beziehen die Aberrationswerte auf 1 μ der Pachytän-Chromosomenlänge. Daher müssen auch die Strukturzustände in diesem Stadium berücksichtigt werden. Die Messungen der frühzeitig kondensierten und extrem kräftig gefärbten, also heterochromatischen Abschnitte der Pachytänchromosomen ergaben beträchtliche Unterschiede für beide *Impatiens*-Arten: Bei *I. Balsamina* mißt man insgesamt 61 μ, bei *I. Sultani* aber 86 μ. Die Gesamtlängen der Pachytänchromosomen beträgt bei *I. Balsamina* 204, bei *I. Sultani* 267 μ. Man kann daraus entnehmen, daß im Pachytän bei beiden Arten fast genau gleich viel Heterochromatin prozentual zur Gesamtlänge vorhanden ist. Leider läßt sich die Masse des Heterochromatins aber im Pachytän nicht messen, da die Dicke der entsprechenden Teile unterschiedlich und nur höchst fehlerhaft zu bestimmen ist. Daher kann nichts darüber ausgesagt werden, ob die gleich großen Chromatinmassen des Ruhekerns in verschiedene Heterochromatinvolumina des Pachytäns überwechseln. Wenn dies der Fall sein sollte, so ließen sich dafür zwei Erklärungsmöglichkeiten angeben. Es könnte zu dem echten Heterochromatin, das im Ruhekern in Form von Chromozentren gefunden wird, noch solches Chromatin hinzukommen, das sich stärker färbt als das „normale Euchromatin" und das deswegen in der Prophase vom echten Heterochromatin nicht zu unterscheiden ist. HANNAH (1951) weist für Dipteren auf interkalares Heterochromatin hin, das sich zytologisch vom Euchromatin nicht scharf differenziert, und meint: "Between two extremes of chromatin there may be a number of loci which under some circumstances act as euchromatic and in other circumstances as heterochromatic." Aber vielleicht hängt die absolute Vermehrung des Heterochromatins

bei *I. Sultani* auch mit jener Erscheinung zusammen, die als Heterochromatisierung des Euchromatins bezeichnet wird: Das Heterochromatin beeinflußt das neben ihm liegende Euchromatin. Der Effekt kann nach Prokofyeva-Belgovskaya und Khvotsova (1939) so stark sein, daß euchromatische Chromatidenteile *die färberischen Eigenschaften des benachbarten Heterochromatins* annehmen.

Diese Betrachtungen bieten eine Möglichkeit, die erhöhte Aberrationszahl von *I. Sultani* zu erklären. Schon einleitend wurde darauf hingewiesen, daß das Heterochromatin nach der Auffassung vieler Autoren besonders bruchempfindlich sei. Die bei *I. Sultani* höhere Rate an chromosomalen Änderungen ließe sich durch die Annahme erklären, daß *das dem Heterochromatin benachbarte Euchromatin an der Anfälligkeit des Heterochromatins teil hat;* die Masse des so beeinflußbaren Euchromatins müßte bei *I. Sultani* deswegen größer als bei *I. Balsamina* sein, weil das Heterochromatin von *I. Sultani* in zahlreicheren Einzelteilen im Euchromatin eingefügt ist als das von *I. Balsamina*.

Jede chromosomale Mutation setzt sich aus dem Bruchereignis und der Verheilung der Bruchflächen zusammen. Die Konsolidierung der Bruchstellen kann so erfolgen, daß der alte Zustand wiederhergestellt wird; in diesem Falle findet man keine Veränderung am Chromosom. Heilen die 2 Flächen eines Bruches unter Bildung neuer Chromosomenenden ab, so ist eine Fragmentierung festzustellen. Schließlich vermögen 4 Bruchflächen aber auch so zu verheilen, daß 2 neue Verknüpfungen entstehen; Translokationen und Inversionen sind die Folgen. Die Unterschiede in den Aberrationszahlen von *I. Balsamina* und *I. Sultani* können auf Differenzen in der Bruchempfindlichkeit selbst beruhen; das *buntere Hetero-Euchromatinmuster* von *I. Sultani* brächte eine *höhere Bruchzahl pro Längeneinheit* mit sich. Die Befunde lassen sich aber auch durch die Annahme erklären, daß 2 Bruchflächen, die aus *gleichem chromatischen Material* bestehen, *leichter zum alten Zustand* wieder verheilen als solche, die an der Grenze von Eu- und Heterochromatin auftreten. Bei gleicher Bruchempfindlichkeit von *I. Balsamina* und *I. Sultani* würden also bei *I. Sultani* deswegen mehr chromosomale Veränderungen in Erscheinung treten, weil *I. Sultani* infolge ihres bunteren Eu-Heterochromatinmusters weniger Verheilungen zum Ausgangszustand der Chromosomen durchführen kann. Da es unmöglich war, die Lage der Chromosomenbrüche in diesen Versuchen festzustellen, ist eine Entscheidung zwischen den Alternativen nicht zu fällen.

Wir hatten nicht die Absicht, die Frage der Dosisabhängigkeit zu behandeln. Dennoch darf auf einige Besonderheiten hingewiesen werden, die von Interesse sind. Es zeigt sich in den F- und T-Werten der Tabelle 4 eine gute Übereinstimmung im Anstieg von 100 auf 200 r, aber der 300 r-Versuch beweist, daß die Schwierigkeiten der Meiosisbeobachtungen eine quantitative Erfassung der Abhängigkeit von Dosis

und Aberrationszahl nicht zulassen. Bei 300 r sind die Effekte bereits so stark, daß die schwerer geschädigten Zellen nicht mehr analysiert werden können. Dadurch bleiben die Werte bei höheren Dosen zu niedrig. Die Zusammenhänge zwischen Heterochromatinmuster und Röntgenwirkung werden von dieser Schwierigkeit nicht betroffen, da wir ja stets Versuche mit gleicher Bestrahlungsintensität verglichen haben. Weiter ist bemerkenswert, daß die F-Zahlen der Anaphase I (Tabelle 5) bedeutend höher liegen als jene der Metaphase (Tabelle 4). Diese Diskrepanz kommt dadurch zustande, daß erst die Anaphasenbewegung alle Fragmente sichtbar werden läßt. In der Metaphase bleibt die Mehrzahl der Fragmente verborgen, d. h., die F-Werte der Metaphase sind zu klein.

Die oben dargelegte Erklärung für das Auftreten stärkerer Sekundäreffekte in Kernen mit bunterem Eu-Heterochromatinmuster dürfte auch für die Primäreffekte gelten. Bei Anwendung von höheren Bestrahlungsdosen, vor allem bei 500 und 800 r, fielen die Verklumpungen und Bewegungsstörungen in den Kernen von *I. Sultani* besonders auf. Diese Primäreffekte beziehen sich hauptsächlich auf die Oberfläche des Chromosoms, die Matrix; ihr jeweiliger Gehalt an Nukleinsäure und deren Zustand ist für das Verhalten der Chromosomen gegenüber Nachbarchromosomen wahrscheinlich maßgebend. Nachdem bekannt ist, daß das Heterochromatin schon unter Normalbedingungen zur Verklebung neigt und daß dieses Chromatin gegenüber der Röntgenwirkung empfindlicher ist als das Euchromatin, dürfte die Vorstellung nicht von der Hand zu weisen sein, das stärker zerstreute Heterochromatin von *I. Sultani* begünstige nach Röntgenbestrahlung in besonderem Maße das Zustandekommen von Chromosomenverklumpungen und anderen zytologischen Primäreffekten.

Zusammenfassung

Pollenmutterzellen von *Impatiens Balsamina* (n = 7) und *I. Sultani* (n = 8) wurden röntgenbestrahlt, um den Einfluß der Verteilung des Heterochromatins auf die Röntgenwirkung festzustellen.

1. *I. Balsamina* zeigt im Ruhekern 14, *I. Sultani* dagegen etwa 50 meist kleinere Chromozentren. Die Volumenmessungen aller Chromozentren ergaben, daß die Massen des Heterochromatins bei Kernen beider *Impatiens*-Arten gleiche sind.

2. Die Untersuchung der Pachytänchromosomen gab Aufschluß über die Verteilung des Heterochromatins längs der Chromosomen. Bei *I. Balsamina* liegt ein heterochromatischer Mittelblock in jedem Chromosom, während bei *I. Sultani* bis zu 5 heterochromatische Stücke auf ein Chromosom verteilt sind. Die Gesamtlängen der Pachytänchromosomen von *I. Balsamina* und *I. Sultani* verhalten sich wie 1 : 1,34.

3. Antheren mit prämeiotischen Ruhekernen bzw. reife Pollenkörner von *I. Balsamina* und *I. Sultani* wurden mit 25, 50, 100, 200 oder 300 r

bestrahlt. Die Pollenmutterzellen wurden in Metaphase I, Anaphase I und Anaphase II auf Fragmente, reziproke Translokationen und Brükkenbildungen analysiert. In der Anaphase der Pollenschlauchmitose wurden nur die Fragmente gezählt. Die gefundenen Werte können verglichen werden, nachdem sie auf 1 μ Chromosomenlänge bezogen wurden.

4. Die Chromosomen von *I. Sultani* zeigten gegenüber denen von *I. Balsamina* oft eine leicht erhöhte Aberrationszahl.

5. Für die erhöhte Röntgenempfindlichkeit der *I. Sultani*-Chromosomen dürfte die stärkere Verteilung des Heterochromatins in ihnen verantwortlich sein. Es bleibt offen, ob die gesteigerte Aberrationszahl auf stärkere Bruchempfindlichkeit oder auf verminderte Restitutionsfähigkeit der bunter strukturierten *I. Sultani*-Chromosomen zurückgeführt werden muß.

6. Auch die Primäreffekte traten bei *I. Sultani* stärker als bei *I. Balsamina* hervor.

Literatur

Bauer, H.: Röntgenauslösung von Chromosomenmutationen bei *Drosophila melanogaster*. I. Chromosoma (Berl.) **1**, 343—390 (1939).

Caspersson, T.: Über Eiweißstoffe im Chromosomengerüst. Naturwissenschaften **28**, 514 (1940).

Darlington, C.D., and L.F. La Cour: Nucleïc acid and starvation of chromosomes in *Trillium*. J. Genet. **40**, 183—213 (1940).

Demerec, M.: Genetic behaviour of euchromatic segments inserted into heterochromatin. Proc. VII. Genet. Congr., p. 99—103, 1939.

Gottschalk, W.: Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. Chromosoma (Berl.) **4**, 298—341 (1951).

Hannah, A.: Localisation and function of heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. Advanc. in Genet. **4**, 87—121 (1951).

Heitz, E.: Der bilaterale Bau der Chromosomen und Autosomen bei *Pellia Fabbroniana*, *P. ephiphylla* und einigen anderen Jungermaniaceen. Planta (Berl.) **5**, 725—768 (1928a). — Das Heterochromatin der Moose. Jb. wiss. Bot. **69**, 763—818 (1928b). — Heterochromatin, Chromozentren und Chromomeren. Ber. dtsch. bot. Ges. **47**, 274—284 (1929).

Kaufmann, B.P.: Distribution of induced breaks in the X-chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **25**, 571—577 (1939).

Marquardt, H.: Die Röntgenpathologie der Mitose. I. II. Z. Zellforsch. **27**, 159 (1938).

Mather, K.: The genetical activity of heterochromatin. Proc. roy. Soc. B **132**. 308—332 (1944).

McClintock, B.: Chromosome organisation and genic-expression. Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 13—47 (1951).

Prokofyeva-Belgovskaya, A.A., and V.V. Khvostova: Distribution of breaks in the X-chromosomes of *Drosophila melanogaster*. C. R. Acad. Sci. USSR. **23**, 270—272 (1939).

Smith, F.H.: Prochromosomes and chromosome structures in *Impatiens*. Proc. Amer. philos. Soc. **74**, 193—214 (1934).

Dr. S. S. Bhattacharjya,
Jute Agricultural Research Institute, Nilganj Bazar, West Bengal, Indien

Chromosoma (Berl.), Bd. 9, S. 319—331 (1958)

From the Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University, Cracow

CINE-MICROGRAPHIC STUDIES ON CHROMOSOME MOVEMENTS IN β-IRRADIATED CELLS *

By

A. BAJER

With 6 Figures in the Text

(Eingegangen am 6. April 1958)

Studies on chromosome movements during mitosis by various methods and on different materials indicate that the movement of chromosomes is a very complex process. Detailed ennumeration of various factors working in mitosis was given by ÖSTERGREN (1949). In general however, two main groups of working factors may be distinguished: chromosomal and spindle factors, which may be considered to determine the movement. In mitosis there seem to exist a main "pulling force" (spindle fibre action) responsible for chromosome movements in prometaphase and partly in anaphase (ÖSTERGREN 1950), and many secondary factors whose cooperation is responsible for final changes of position. In anaphase a second kind of force resulting from the pushing body (Stemmkörper of BĚLAŘ 1929) may also act, and the relative importance of these two factors i.e. traction fibres and pushing body is different in different species (RIS 1943).

In the hope that the action of various factors might be more sharply distinguished, cells were irradiated to induce chromosome fragmentation. The main purpose was to observe the movements of fragments and to compare them with the movements of chromosomes during normal mitosis.

Material and Methods

Endosperm of *Haemanthus katharinae* BAK. was used as material. Methods of endosperm studies *in vitro* were described previously (BAJER 1955, 1957).

Whole fruits with ovules in suitable stages for observations on mitosis were irradiated. Fig. 1 shows the method of irradiation. After irradiation the fruits were placed in a Petri dish with moist blotting paper at room temperature (21° to 25° C) and observations were made at the same temperature.

* This work was financed by the Division of Health of the Institute of Nuclear Research, Warsaw, under contract No 135/NZ/56. The author is also grateful to the Institute of Nuclear Physics of the Polish Academy of Science, Cracow, for facilities to use the radioactive isotopes.

In this paper only a few aspects of mitosis in irradiated cells will be dealt with. A more detailed analysis will appear elsewhere.

A mixture of the radioactive isotopes of caesium and strontium was used as source of irradiation. The dose was 10 μC for 8 hrs. After such a dose mitoses appear again 24—36 hrs. after irradiation. Observations were usually carried out 36—48 hrs. after the end of the irradiation. Usually the first, and sometimes the second mitosis, was observed. The source gave almost exclusively β-rays which are well known (LEA 1955, SPEAR 1953) not to be strongly penetrating and consequently it was not possible to estimate exactly the real dose which caused the observed disturbances. They penetrated through cellophane and through plant tissue having a thickness of 7 mm or even more. β-rays are efficient in causing chromosome aberrations, however, due to their low penetrating power, different degrees of demage were found in different cells of the same ovule.

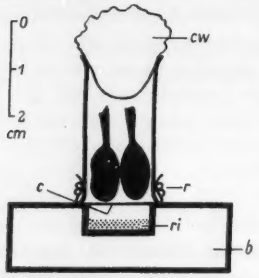

Fig. 1. Irradiation of the ovules. Whole fruits (black) are placed in a glass cylinder with cellophane bottom (*c*) fixed with rubber band (*r*). The cylinder is stoppered with moist cotton wool (*cw*). The radioactive isotopes (*ri*) are placed in a brass holder (*b*). The distance between the surface of the radioactive isotopes and the cellophane is about 3 mm

The course of mitosis was recorded on 16 mm Agfa Superpan film with the use of a phase contrast equipment (Zeiss, Jena). It appeared that the irradiated cells were more sensitive to light than non-irradiated cells. For this reason the pictures were usually taken at the rate of 1 to 2 frames per minute, projection being always 16 frames/sec.

Observations on non-irradiated cells

The movements of chromosomes in normal mitosis were analysed previously, and some summarized conclusions from the previous studies (BAJER 1954, 1957, 1958a, b, BAJER and MOLÈ-BAJER 1956) will be given here.

In prophase the changes of position of the chromosomes are slight and the chromosomes start their movements after the mitotic contraction stage. The contraction stage is: "the stage lasting for a few minutes prior to prometaphase when the scattered chromosomes which had in late prophase formed a loose ball aggregate suddenly into a tighter central mass" (BAJER and MOLÈ-BAJER 1956, p. 561). It follows upon the dissolution of the nuclear membrane (BAJER 1958). The forces causing the aggregation of the chromosomes into a central group act from all sides of the nucleus, but the strongest action is from those sides where the "clear zone" (BAJER 1957) is largest (Fig. 6). After the contraction stage the cooperation of the spindle and the kinetochores manifests itself and sometimes even the moment in which this cooperation begins can be noticed (BAJER 1958a). After this stage the chromosomes are guided in their movements by the kinetochores and the orientated structure of the spindle appears.

After the kinetochores have become attached to the spindle two components of the movement of the chromosomes may be distinguished: 1. kinetochore movements, 2. arm movements.

1. Kinetochore movements. During prometaphase the kinetochores show a strong tendency to arrange themselves in the equatorial metaphase position. The change from the prophase to the metaphase position is not always achieved by the simplest and shortest way i.e. the kinetochores may first move towards the pole and then

return to the plate, and may move across the spindle, etc. However, during the formation of the metaphase plate the kinetochores show a strong tendency to move parallel to the long axis of the spindle. During all these movements the guiding role of the kinetochores is evident; this is even more clearly visible during anaphase (cf. Fig. 6).

2. Arm movements. The movements of the chromosome arms are partly determined by the kinetochore movements, but they also execute some other movements. During prometaphase there is a strong tendency for the arms to become arranged approximately parallel to the long axis of the spindle and probably parallel to the submicroscopic structure of the spindle. At the same time when the kinetochores move towards the plate the arms straighten. The forces causing the straightening of the arms act towards the spindle poles and seem to cease during anaphase (Fig. 6).

Very peculiar movements of the arms are often observed, and they were described as *abrupt bending movements* (BAJER 1958b). During these movements the arms suddenly bend towards the spindle equator and then straighten out again. These movements were observed in prometaphase, metaphase and anaphase. The force causing this bending acts on the end of the chromosome arm or at some distance between the end and the kinetochore; the force is very localised i. e. it acts in a very limited area of the spindle. These movements cease during colchicine mitosis (MOLÈ-BAJER 1958) and it was concluded that they are probably caused by changes in the spindle structure. The force causing the first part of the movement (that towards the spindle equator) acts from the pole; the second part of the movement (i.e. the straightening of the arms) may be caused by the same force that is responsible for the straightening of the arms during prometaphase of normal mitosis, or by a special force; also the elasticity of the chromosomes play a role (Fig. 6).

Mitosis in irradiated cells

In irradiated cells the course of mitosis is much prolonged and different types of chromosome abnormalities are to be observed: chromatid breaks, centric and acentric fragments, dicentric and triradial chromosomes, ring-chromosomes—often dicentric and interlocking at anaphase.

The course of prophase in irradiated cells is the same as in normal mitosis. The "clear zone" around the prophase nucleus, i.e. the cytoplasmic constituent of the mitotic spindle (BAJER 1957), forms around the nucleus (cf. Fig. 3, 0′ time). When the clear zone reaches its maximal dimensions, the nuclear membrane breaks, and this is followed by a short contraction stage (cf. p. 320). After this stage the activity of the kinetochores begins.

The differences between irradiated and non-irradiated cells are first seen during prometaphase during the formation of the metaphase plate and are clearly observable in cells with numerous chromosome fragments. These fragments move out of the spindle in the direction of the poles at the same time at which the chromosome arms straighten in normal mitosis, and the fragments are finally eliminated from the spindle (Figs. 2—3). If the fragments in such cells are in the middle of the spindle their paths towards the poles are parallel to the long axis

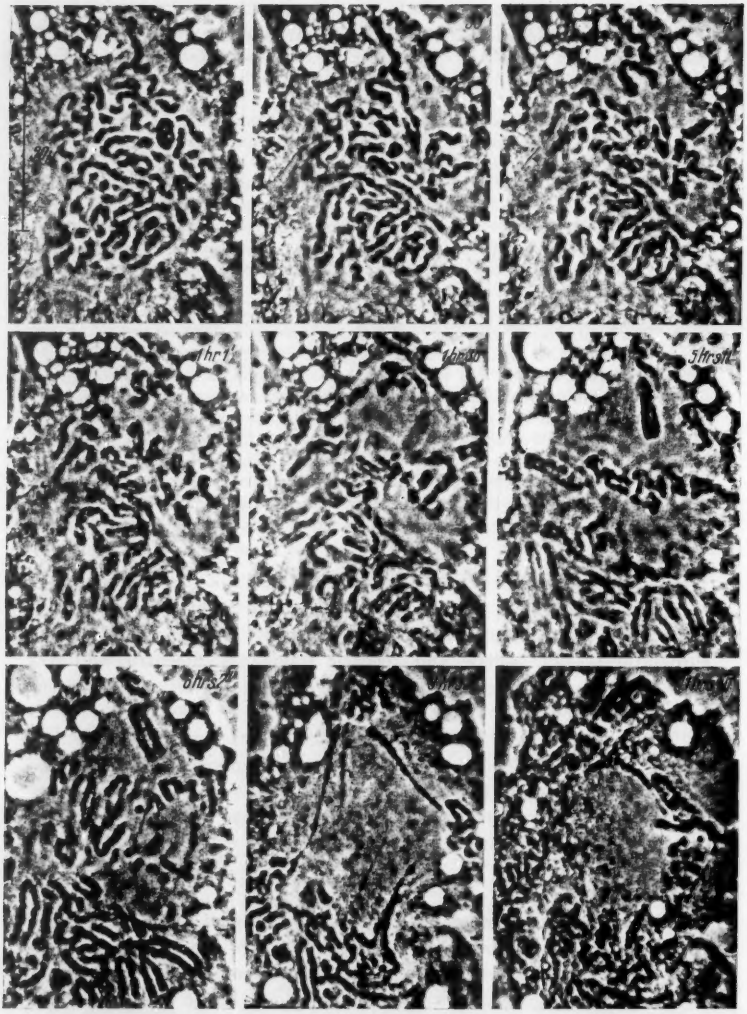

Fig. 2. Elimination of chromosome fragments in prometaphase. During prophase chromosome fragments are uniformly distributed inside the nucleus. In prometaphase they are eliminated towards the poles. 0': Prophase, before the nuclear membrane breaks. Only slightly irradiated cell. It is not possible to distinguish fragments inside the prophase nucleus. The clear zone (cf. BAJER 1957) is formed around the whole nucleus including one chromosome arm which is stretched into the cytoplasm. 33': Prometaphase, just after the

of the spindle. Fragments nearer the periphery often pass into the cytoplasm at the sides of the spindle. It seems that they may be pushed into the cytoplasm by the main group of fragments moving towards the pole. After these movements the fragments are usually in the cytoplasm near the poles, but, sometimes they are arranged uniformly around the whole spindle. It seems possible that in some exceptional cases not only acentric fragments, but also apparently centric ones, may be removed in this way. An example of such movement seems to be seen in the cell in Fig. 2. This elimination of centric fragments may be due to the fact that the process began before the attachment of the kinetochores to the spindle. In such cells some centric fragments seem to push the others. It is, however, very difficult to find out whether some of the fragments have kinetochores or not, as after iso-chromatid breakage and sister reunion the chromosomes may appear to be acentric fragments, though they are similar to centric ones. Therefore the interpretations given above should only be considered to be tentative suggestions only.

An interesting movement of a fragment during prometaphase was observed (Figs. 3, 4). A small fragment, moved towards the pole approximately at the same time as all the other fragments, and near the pole of the spindle it stopped for a moment, and then moved quickly towards the spindle equator, passed it moving in the same direction towards the second pole, and finally was eliminated into the cytoplasm.

The metaphase plate is usually regular, but the duration of metaphase is longer than in normal cells. No multipolar anaphases were observed.

The first stages of anaphase are usually much prolonged in cells with severe chromosome abnormalities, mainly as a result of mechanical difficulties in separating the dicentric chromosomes and the strong bridges. In cells with numerous abnormal chromosomes it is seen that the movement of the chromosomes is accelerated as the bridges stretch and also after their breaking. During anaphase the chromosome fragments around the spindle, and especially those on the two sides of the poles, move in the direction of the cell equator. The movement is caused by the piston action of the half-spindles on the cytoplasm during the anaphase stretching of the spindle. This movement of cytoplasm

rupture of the nuclear membrane. The chromosomes begin to straighten (cf. BAJER 1958b). 40′: Elimination of the fragments from the spindle begins. 1 hr 1′: The movement of fragments towards the poles is continued. More fragments are eliminated at one pole than at the other. 1 hr 30′: Few fragments are visible at one pole and a considerable number at the other. Only few centric fragments form the metaphase plate. 5 hrs 11′: Metaphase plate just before anaphase begins. In this cell prometaphase lasted less than two hours, while it was another three hours before anaphase began. The duration of anaphase was long: the 4 hrs from the beginning of anaphase (5 hrs 11′) until late anaphase (9 hrs 21′) are about 4 times longer than normal anaphase in non-irradiated cells. This is partly due to the strong bridges which prevent the normal anaphase separation. 11 hrs 40′: Formation of resting nuclei. 16 mm cine-film

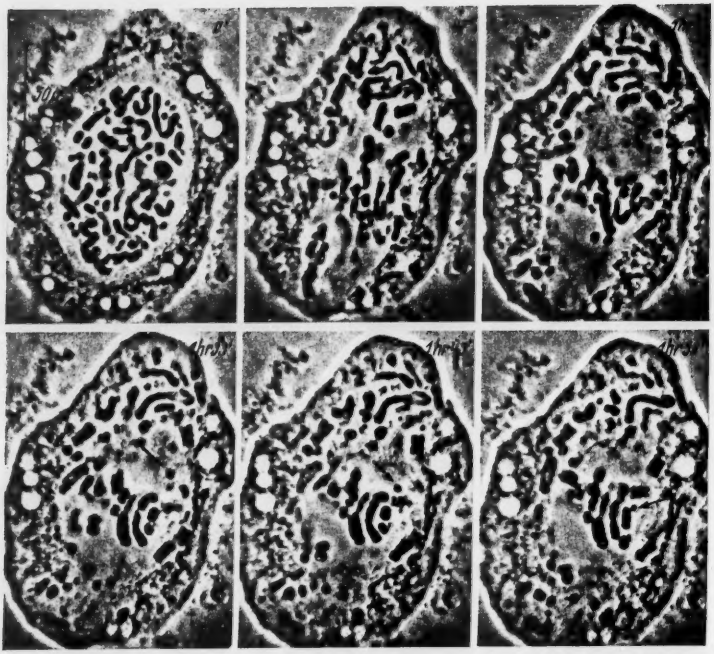

Fig. 3. Elimination of fragments during prometaphase and an exceptional case of a movement of one fragment (cf. text). Strongly irradiated cell, fragments are numerous and are distinguishable in prophase. 0′: Late prophase just before the nuclear membrane breaks. 47′: Prometaphase a few minutes after the nuclear membrane breaks; some acentric fragments have moved towards the poles and centric ones have begun to form the metaphase plate. 1 hr 7′: Only a few fragments form the plate and acentric fragments are arranged around the poles and on the sides of the spindle. The arrangement of these acentric fragments does not change considerably in later stages. 1 hr 33′ to 4 hrs 30′: The metaphase begins to be more and more regular. The strange movement of one fragment whose path is drawn in Fig. 4 is indicated by an arrow. 16 mm cine-film

containing chromosome fragments is more or less clearly visible in all anaphase cells and has been analysed in detail (BAJER and MOLÈ-BAJER 1956).

Interesting movements are observed in late anaphase and in early telophase (Fig. 5). At these stages there is one chromosome group at each pole and many of the fragments are arranged in the equatorial region where the cell plate begins to form at this stage. Simultaneously with the formation of cell plate the fragments from the equatorial region move towards the poles. This movement gives a strong impression of a *second anaphase at the beginning of telophase*. Through this process

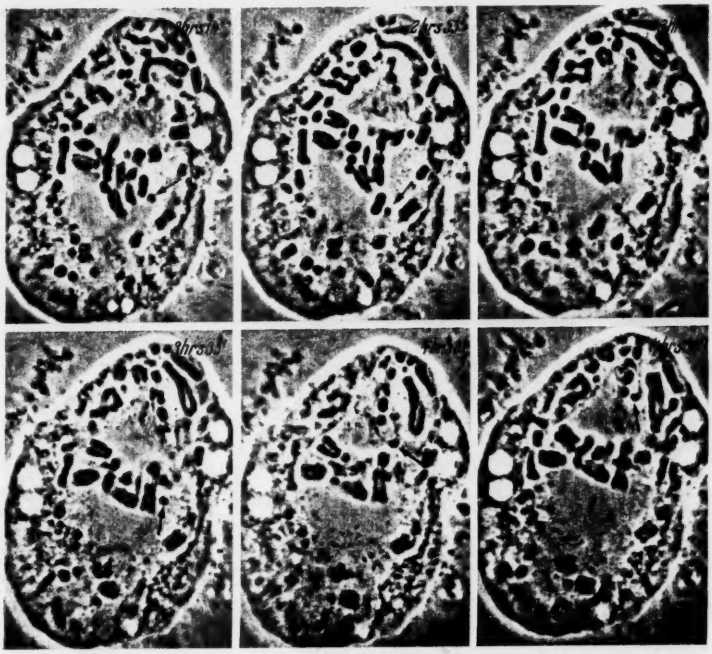

Fig. 3. (Continued)

the phragmoplast is cleared from fragments and this effect chromosomes caught by the cell wall may be torn during this movement. The force responsible for this movement is probably the same as causing the movement of small particles towards the poles during telophase (BAJER and MOLÈ-BAJER 1956). This force sometimes causes further separation of nuclei during or after the cell plate formation: *daughter nuclei move apart during the formation of the phragmoplast.* This force is quite different from the pushing body action in anaphase, it begins to act after the pushing body action has ceased. Similar movement was also noticed previously at telophase of irregular meiosis in hybrids by ÖSTERGREN (1957), and STICH (1954) described related phenomena in *Cyclops.*

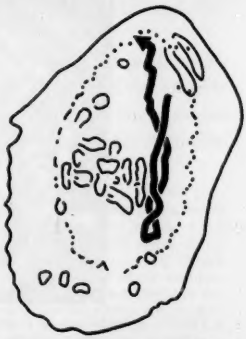

Fig. 4. Drawing of path of fragment marked in Fig. 3 by an arrow

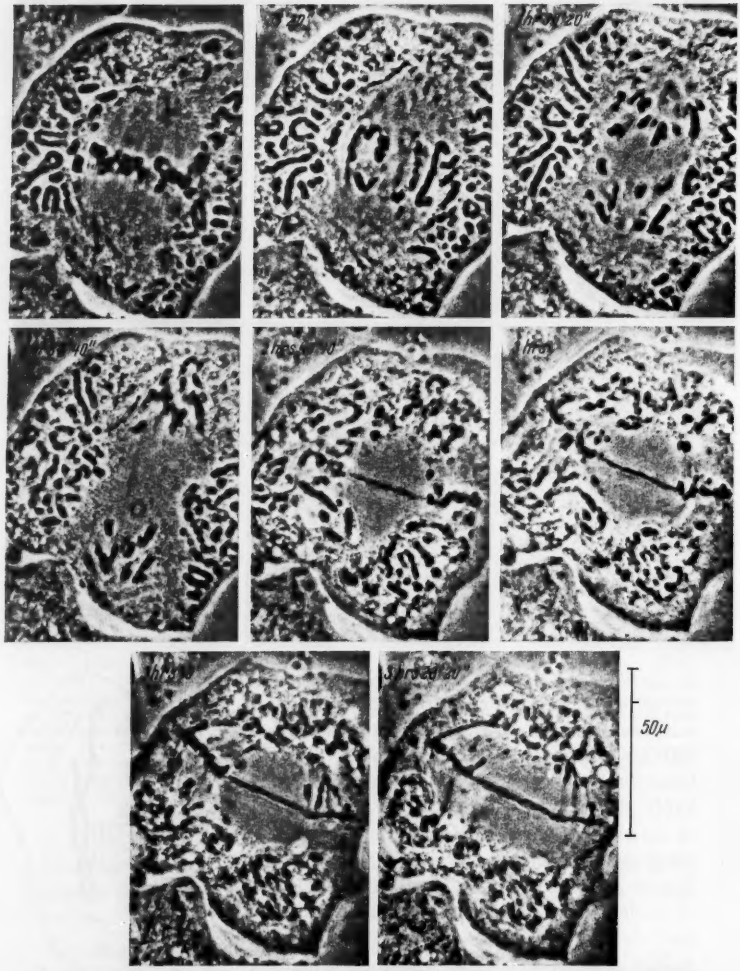

Fig. 5. Elimination of fragments during ana-telophase. In metaphase the fragments are arranged in the cytoplasm around the spindle. During anaphase they are pushed to a position around the spindle equator and during the formation of the phragmoplast they move towards the poles. In this way the phragmoplast is cleared of fragments and this process gives the impression of a second anaphase during telophase. 0′: Metaphase plate just before anaphase begins. Few chromosome fragments form the plate. Acentric fragments are arranged around the spindle and mostly on both sides of the spindle. The outlines of the spindle (the border between the spindle and the cytoplasm) are visible. 33′ 20″: The anaphase is very slow; strong bridges prevent rapid anaphase movement. The spindle

Discussion and conclusions

Before considering some of the questions which arise from this work it is necessary to discuss whether the spindle in irradiated cells is normal with respect to its structure and function and whether the processes observed in irradiated cells may also occur in normal mitosis. As the spindle is built up *de novo* before each mitosis, it was not influenced directly by the irradiation in the present experiments. Also the spindle is to a large extent produced from cytoplasmic material, which is less sensitive to irradiation (SPEAR 1953, LEA 1956) than the nucleus. The formation and the development of the spindle seemed to be perfectly normal. The same applies to its activity: all kinds of movements inside the spindle observed during mitosis in irradiated cells are also found in normal mitosis, though some of them are more easily seen after irradiation. Knowing, however, that they exist, it is not difficult to find them in normal mitosis. In irradiated cells all the disturbances in the course of mitosis seem to be caused by abnormalities of the chromosomes, but the mechanism of their movements seems to be perfectly normal. Therefore in the author's opinion all conclusions from the present material concerning the forces acting during mitosis may be fully applicable also to normal mitosis.

The evidence for the existence of some of the forces acting during normal prometaphase was given previously (BAJER 1958b). *The conclusions* in this report and the previous papers concern the *direction of the acting forces, their number and general properties, but not their nature.* Some of the forces seem to be strictly connected with the activity of the kinetochores and some with the function or organization of the spindle. *So far the existence of the following forces may be deduced:*

A. The force causing the movement of the kinetochores during prometaphase and metaphase. This is a "pulling force", or "action of the spindle fibres" and though the nature of this force is not known, there seems to be no doubt that the "pulling" acts on or through the kinetochore.

is only slightly longer than in metaphase. The half-spindles decrease in length. 1 hr 33′ 20″: Beginning of pushing body action; the length of the spindle increases. Acentric fragments on both sides of the spindle are motionless. 2 hrs 6′ 40″: Late anaphase. The length of the spindle has increased considerably in comparison to that at 0′. The movement apart of the whole half-spindles, with the chromosomes, acts similar to the movement of a loosely fitting piston within a cylinder (BAJER and MOLÈ-BAJER 1956) and consequently some acentric fragments, which during metaphase were arranged near the poles, are pushed towards the spindle equator. Centric fragments are at the two poles, while acentric ones form two groups on both sides of the spindle. The duration of anaphase is about twice as long as in normal non-irradiated cells. 2 hrs 46′ 40″: The phragmoplast is partly formed and the cell plate is in the middle of it. Acentric fragments, which are arranged on both sides of the spindle, have moved towards the poles. These movements of acentric fragments are continued in both the next micrographs: 3 hrs and 3 hrs 10′. 3 hrs 23′ 20″: The phragmoplast is almost completely cleared of fragments. The force responsible for these movements is of considerable strength and some acentric fragments, which were already caught in the cell plate, are stretched and torn during the movement cf. e.g. 3 hrs 10′ and 3 hrs 23′ 20″. 16 mm cine-film

This force acts in the half-spindles towards the poles and its action was analysed in detail by ÖSTERGREN (1950). On each individual-chromosome the forces act towards both poles during prometaphase and towards one pole only during anaphase (Fig. 5).

B. The force responsible for the straightening of the arms of the chromosomes during prometaphase. This is manifested as a tendency of the arms to arrange themselves parallel to the long axis of the spindle (the δ factor of ÖSTERGREN 1949). This force is probably also responsible for the elimination of persisting nucleoli (the γ factor of ÖSTERGREN 1949). It acts in the half-spindles from the spindle equator towards the poles. Its action during prometaphase seems to be quite clear and it does not seem to exist during anaphase or its demonstration at this stage may be obscured by other circumstances. This force may presumably be connected with the gradient of the structural change in the spindle i.e. the different organization of the spindle and the continuous change of this structure towards the poles (STICH 1954). Also the elasticity of the chromosomes is likely to pay a certain role in their straightening.

C. The force causing the abrupt bending movements of the chromosomes during prometaphase (BAJER 1958b). It also acts in the half-spindles in metaphase and early anaphase. During the first part of a movement of this kind there is a force acting from one of the poles towards the spindle equator. This force seems to be closely connected with the submicroscopic organization of the spindle because it is non-existent in colchicine mitosis (MOLÈ-BAJER 1958). The force acts within a very limited area of the spindle and is probably responsible for the rarely occurring cases of movement of acentric fragments from the poles to the spindle equator in prometaphase (cf. p. 323). The final elimination of these fragments from the second half-spindle may be achieved by the force responsible for the straightening of the arms.

D and E. Two forces act in the anaphase half-spindles i.e. the *forces A and C described above, and also there appears a new force* (pushing body action — Stemmkörperwirkung of BĚLAŘ 1929) *causing the elongation of the interzonal region and consequently pushing the whole half-spindles apart* (D — Fig. 5). This force acts towards the spindle poles from the middle of the interzonal region. Pushing body action usually begins some time after the beginning of anaphase and it ceases in late anaphase. It is not known exactly how the pushing body acts. It may act: (1) on the border between the half-spindles and the interzonal region thus being able to push the half-spindles apart without bending the chromosome arms, or (2) there may be a continuous transition between the interzonal region and the pushing body, as was suggested by RIS (1949). The consistency of the interzonal region during anaphase is much less viscous than that of half-spindles, and the more liquified the interzonal

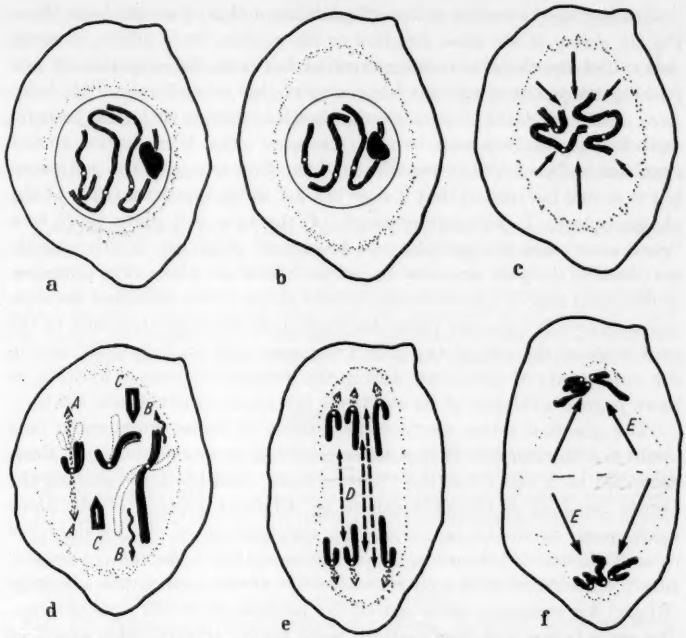

Fig. 6a—f. Schematic drawings of the direction of the forces acting during mitosis. Kinetochores—white circles. a: First stages of the formation of the "clear zone" (cytoplasmic constituent of the mitotic spindle). Clear zone uniformly developed. b: Clear zone non-uniformly developed just before the disappearance of the nuclear membrane. Different cases of the development of the clear zone were described previously (BAJER 1957). c: The forces causing the aggregation of the chromosomes after the disappearance of the nuclear membrane i.e. the mitotic contraction stage. The chromosomes are passively pushed towards the centre of the nucleus. The forces act from all sides but are stronger from the sides where the clear zone is better developed. d: Prometaphase—metaphase. *A* — a "pulling force" connected with the activity of the kinetochores. *B* — a force causing the straightening of the arms of the chromosomes and the tendency of the arms to arrange themselves parallel to the spindle axis. Most probably this force is also responsible for the elimination of fragments during prometaphase and elimination of persitent nucleoli. *C* — a force causing abrupt bending movements (BAJER 1958b) which acts towards the spindle equator. The second part of this movement i.e. the movement towards the pole may be a specific force (white arrow within the black one), or this force may be non-existent and the movement caused by forces *A* and *B*. e: Anaphase—pushing body effect (*D*). The force *A* ceases its action. Changes in the pushing body cause the whole half-spindles to move apart. The pushing body has a much lower viscosity than the half-spindles and it does not cause the bending of the chromosome arms. The pushing body acts on the boundary between the kinetochores and the half-spindle, or acts on the spindle pole (cf. text p. 328). f: Effect of phragmoplast. This force (*E*) appears during the formation of the cell plate and acts on the whole chromosome groups or nuclei. It bends the chromosome arms in telophase and removes all particles and fragments from the area of the phragmoplast equator towards the poles

region is, the more efficient is its action in pushing apart the half-spindles (BAJER 1953).

During the formation of the cell plate the action of a new force (E — Fig. 5), *acting in the same direction as the pushing body action, seems to start.* Usually there is a time interval between the cessation of the pushing body action and the beginning of this other force. *This latter force, acting inside the phragmoplast, causes the movements of small particles and chromosome fragments towards the poles.* The force begins to act simultaneously with the appearance of the first traces of the cell plate, but it should be stressed that it does not act in the equatorial area of the phragmoplast. In the environment of the new cell plate there is a "dead zone" and the particles and fragments which are in this zone do not move to the pole, and may be caught by the cell plate. The existence of this dead zone is also indicated by the shape of the stretched chromosomes caught by the cell plate; they are most strongly stretched in the proximity of the cell plate. This force may play an important role in the movements of univalents during the irregular meiosis of hybrids, as there is good evidence of its existence in meiosis (ÖSTERGREN 1957).

The question arises whether the number of forces enumerated here might not be reduced. It is possible that two or more forces e.g. those described in A and C i.e. the "pulling force" and the force causing the abrupt bending movements might be different aspects of the same mechanism, or might be purely the consequence of the existence of certain structure. According to ÖSTERGREN (1958) the factors responsible for the removal of acentric bodies out of the prometaphase spindle (B) and for removing those out of the phragmoplast (E) are the same. The same factor and not pushing body action (HEITZ 1943) would be responsible for the bending of the arms in late anaphase.

It may be useful for the analysis of these forces, however, to distinguish them and analyze them separately. *Thus five groups of forces may be distinguished:* 1. *activity of kinetochores* ("pulling force"), 2. *local changes inside the spindle organization* (abrupt bending movements), 3. *activity of the half-spindles as a whole* (straightening of the arms, elimination of particles and nucleoli), 4. *activity of the interzonal region in anaphase* (pushing body action), 5. *activity of the phragmoplast* (elimination of bodies from the phragmoplast—clearance of the phragmoplast).

Summary

1. Endosperm of *Haemanthus katharinae* was irradiated with β-particles and the course of mitosis in cells with fragmented chromosomes was recorded on cine-film by means of time lapse equipment.

2. The development of the mitotic spindle appeared to be normal in irradiated cells.

3. During prometaphase many chromosome fragments passed towards the poles and were eliminated into the cytoplasm. A few frag-

ments executed very peculiar movements to the pole and returned to the plate.

4. During phragmoplast formation the acentric fragments left in the equatorial region moved towards the poles, and gave the impression of a second anaphase during early telophase.

5. An attempt is made to point out the existence and direction of some forces working during mitosis. However, no conclusions concerning their nature is given.

Acknowledgments. It is a great pleasure for the author to express his deepest gratitude to Miss AUDREY M. GLAUERT from Strangeways Research Laboratory, Cambridge, to Dr. GUNNAR ÖSTERGREN from Institute of Genetics, University of Lund, and to Dr. DOUGLAS DAVIDSON from Department of Genetics, University of Oxford, for very valuable suggestions, kind and constructive criticism and much help during the preparation of this paper. The author is also most grateful to Dr. ÖSTERGREN for permision to enclude some of his unpublished results.

References

BAJER, A.: Absolute viscosity and living mitotic spindle structure. Acta Soc. bot. polon. **22**, 331—348 (1953). — Living smears from endosperm. Experientia (Basel) **11**, 221 (1955). — Ciné-micrographic studies on mitosis in endosperm. III. Exp. Cell Res. **13**, 493—502 (1957). — Ciné-micrographic studies on mitosis in endosperm. IV. Exp. Cell Res. **1958**a (in the press). — Ciné-micrographic studies on mitosis in endosperm. V. Exp. Cell Res. **14**, 245—256 (1958).

BAJER, A., and J. MOLÈ-BAJER: Ciné-micrographic studies on mitosis in endosperm. II. Chromosoma (Berl.) **7**, 558—607 (1956).

BĚLAŘ, K.: Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. II. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **118**, 359—484 (1929).

HEITZ, E.: Kleinere Beiträge zur Zellenlehre. I. Zur Kenntnis der Stemmkörperwirkung. Ber. schweiz. bot. Ges. **53**, 193—199 (1949).

LEA, D. E.: Actions of radiations on living cells, 2. edit., p. 416. Cambridge: Cambridge University Press 1955.

MOLÈ-BAJER, J.: Cine-micrographic analysis of c-mitosis. Chromosoma (Berl.) **9**, 332—358 (1958).

ÖSTERGREN, G.: A survey of factors working at mitosis. Hereditas (Lund) **35**, 525—528 (1949). — Considerations of some elementary features of mitosis. Hereditas (Lund) **36**, 1—18 (1950). — The course of meiosis in a case of abnormally prolonged chromatid pairing. Ark. Zool. (Stockh.) **11**, 130—131 (1957). — 1958 (personal information).

RIS, H.: A quantitative study of anaphase movement in the aphid Tamalia. Biol. Bull. **85**, 164—179 (1943). — The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of the grasshopper. Biol. Bull. **96**, 90—106 (1949).

SPEAR, F. G.: Radiations and living cells, p. 222. London: Chapman & Hall 1953.

STICH, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. Chromosoma (Berl.) **6**, 199—236 (1954).

Doc. Dr. A. BAJER, Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University, Grodzka 53, Cracow, Poland

Chromosoma (Berl.), Bd. 9, S. 332—358 (1958)

From the Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University, Cracow

CINE-MICROGRAPHIC ANALYSIS OF C-MITOSIS IN ENDOSPERM

By

J. Molè-Bajer

With 15 Figures in the Text

(Eingegangen am 24. März 1958)

Introduction

The results obtained by most workers examining the influence of colchicine on plant and animal mitosis are in agreement as to the general picture of colchicine-induced changes (Eigsti and Dustin 1955). However, differences may be found in the more detailed observations and interpretations. In the opinion of most of the authors colchicine prevents the formation of the spindle, or causes the loss of its submicroscopic organization. Strong support for the latter opinion was given by Inoué (1952, 1953), who proved that birefringence of the spindle disappears under the action of colchicine and that the process is reversed when this action ceases. The spindle or rather the nuclear space as a whole, may retain its form though it does not possess the structure and appearance of the normal spindle. Mazia (1955, 1956a, b) found that both the normal and "colchicine spindle" could be isolated from the cell, but that the latter did not resemble the normal spindle. Stich (1954) showed that the spindle materials (RNA, polysaccharides) are accumulated during c-mitosis, as in normal mitosis. However in c-mitosis this is not followed by the submicroscopic organization of these materials. In some cases the spindle which is already organized in the normal manner may be destroyed by the colchicine and form a special body—the "hyaline globule" (Goulden and Carlson 1951).

Observations *in vitro* on c-mitosis are not numerous. The authors cited above were interested in the behaviour of the mitotic spindle, the changes in its structure (Wada 1940, Goulden and Carlson 1951, Inoué 1952), and in the influence of colchicine on cell metabolism, changes in the mitotic index, prolongation of particular phases and sensitisation to other agents. Most of the work was done on animal material (literature cited in d'Amato 1948, 1950 and Eigsti and Dustin 1955).

In the previous studies on mitosis in endosperm the course of spindle formation and chromosome movement have been described in detail (Bajer 1954, 1957, Bajer and Molè-Bajer 1956). On the assumption

that under the influence of colchicine the organized spindle structure is non-existent and the sequence of chromosome changes is approximately normal, it seemed of special interest to study the changes of chromosome position during c-mitosis. Also changes in the spindle were studied. The work was undertaken in order to compare the course of c-mitosis with normal mitosis. It was supposed that colchicine may cause the elimination of some changes or processes and that their absence during c-mitosis might aid analysis of the dynamic changes in normal mitosis.

Material and methods

The material used was endosperm of *Haemanthus katharinae* BAK. at a suitable stage. The methods of handling endosperm *in vitro* have been described previously (BAJER 1954, BAJER and MOLÈ-BAJER 1954); also a simple method for examining the action of chemicals was given (MOLÈ-BAJER 1955). Colchicine was added to the glucose-agar on which the endosperm was prepared. Most of the work was done on 0.5% agar with 3.5% glucose and 50 ppm. (0.005%) colchicine. Unless otherwise mentioned, the results to be described were obtained with this concentration in agar. Some observations were made also with concentrations of colchicine (in glucose-agar) from 10000 to 1 ppm.

This method, though very useful and easy, does not permit one to work always with exactly the same concentration of colchicine. The endosperm cells with the endosperm liquid are spread on a cover slip smeared with agar and colchicine. Therefore the colchicine concentration varies with the amount of endosperm liquid, and the real acting concentration was lower than 50 ppm. Probably it was not higher than 40 ppm. and not lower than 20 ppm. This, however, seems to be of no great importance because the results of all experiments always agree in all respects. Also there may be additional influence of glucose on colchicine. According to CORNMAN (1950) the presence of glucose causes partial inactivity of colchicine. However BENITEZ, MURRAY and CHARGAFF (1954) did not find this action in tissue culture of rat neuroblasts.

It appeared that colchicine exerts a strong photodynamic action on the cells so that they were much more sensitive to light than normally and irreversible lethal changes were easily caused by too strong illumination. In consequence the number of frames taken per second was reduced to a minimum (1—3 records/min., mostly 2 records/min., with projection 16 frames/sec.; 16 mm Superpan Agfa film). Phase contrast (Zeiss-Jena) equipment was used. The methods of film analysis have been given previously (BAJER and MOLÈ-BAJER 1956, BAJER 1957).

Results

I. The beginning of colchicine influence

Concentrations of colchicine in agar higher than 50 ppm. change both the structure of the resting nuclei, in which the refrective index alters and the structure becomes coarser, and the apperance of the chromosomes of dividing cells changes. At these concentrations (500 to 1000 ppm.) mitosis was stopped in a few minutes, this being followed by rapid death of the cell. Fast penetraction and action of colchicine was previously reported by STEINEGGER and LEVAN (1948, 1949).

At concentrations lower than 50 ppm., e.g. 10 ppm., the course of mitosis continued normally during the first hours of the application of colchicine. At these concentrations c-metaphases and c-anaphases were found several (10 or more) hours after preparation, while in other cells of the same preparation the normal course of mitosis was observed. No changes at all were found with 1 ppm. and lower concentrations; whenever observations were made, the course of mitosis was perfectly normal.

The description given below concerns a concentration of 50 ppm. only. The effects of this concentration in agar are very uniform. In the same preparation, the effect of colchicine may not appear in all the cells immediately, but it will appear in a short time not exceeding 30 min. The typical result of colchicine action leads to the formation of a restitution nucleus. In some cells after a typical course of c-mitosis instead of one nucleus a few smaller ones originate. They are formed in those cells in which the chromosomes do not form a compact group but are scattered over a large area.

Reviewing the influence of colchicine on different stages of mitosis, the following statements can be made: There is but little influence on cells which during the time of preparation are in late telophase with well formed phragmoplasts and in which cell plate begins to form. The formation of the cell plate is not interrupted and the only visible effect seems to be a shortening of the distance between the daughter nuclei.

In cells in earlier telophase the formation of the phragmoplast and the cell plate is interrupted. The two daughter nuclei come considerably nearer to each other and in some cells even seem to touch each other. However, no example was observed of daughter nuclei actually fusing. The behaviour of most cells in late anaphase is similar to that in early telophase.

In cells which at the time of preparation are in early and middle anaphase (in exceptional cases in late anaphase also) one restitution nucleus is formed which has usually an irregular outline. During projection of the film it can be seen that, as the movement of chromosomes towards the poles is abruptly stopped, the spindle and interzonal region are destroyed, and the chromosomes move slightly backwards; this is followed by the formation of the restitution nucleus. Similar observations were reported by Nebel and Ruttle (1938).

The cells which at the time of preparation are in metaphase usually form typical restitution nuclei without serious destruction of the metaphase plate. More than one nucleus is more often formed after treatment of metaphase than of that of other stages. Cells may also enter anaphase, but this is stopped in the early stages.

The cells which at the time of preparation are in prometaphase enter c-metaphase and the further stages of c-mitosis.

The influence on prophase, which is always followed by typical stages of c-mitosis is described below, the development of the clear zone and the chromosome movements being the two main features dealt with. The course of prophase under the influence of colchicine is only slightly modified in comparison to prophase in normal cells, which supports conclusions of Bucher (1939).

II. Duration of mitosis

The time for the different phases of normal and c-mitosis in several cells are given in Table 1. As it is difficult to distinguish the different stages of prophase we only consider the time of the latter stages which can be established more exactly. In the whole course of mitosis it is only possible to establish with an accuracy of a few minutes the time of the breaking of the nuclear membrane and of the beginning of c-anaphase. The next steps are the formation of the restitution nucleus and the appearance of the nucleoli which can be timed with an accuracy of 30 min. to 1 hour.

Table. *Duration of normal and c-mitosis in Haemanthus katharinae*

No. of cell	Time in minutes between dissolution of nuclear membrane and: metaphase	start of anaphase	start of cell plate formation (in brackets the formation of cell plate)	formation of nuclei	nuclei with nucleoli	Time in minutes between beginning of anaphase and nuclei (without nucleoli) formation
			Normal cells			
405	106 ± 5	185	297 (37)	360 ± 5		175 ± 5
382	106 ± 5	228	334 (26)			
10	124 ± 5	141	194	265 ± 5		124 ± 5
11	124 ± 5	140	195	265 ± 5		125 ± 5
12	80 ± 5	106	185 (26)	318 ± 5		212 ± 5
13	115—132.	190	389 (26)	432 ± 5		242 ± 5
14	124 ± 5	177	265 (44)	309 ± 5		132 ± 5
15		141	256 (31)	274 ± 5		133 ± 5
16	79 ± 5	119	212 (33)	265 ± 5	390 ± 10	146 ± 5
17	132 ± 5	146	252 (39)	265 ± 5	371 ± 10	119 ± 5
18	132 ± 5	172	265 (40)	265 ± 5	371 ± 10	93 ± 5
19	79 ± 5	119	185 (13)	238 ± 5	344 ± 10	119 ± 5
mean	110 ± 5	155	252 (31)	295 ± 5	346 ± 10	147 ± 5
			C-mitosis			
238		365		497 ± 5	662 ± 10	132 ± 5
207		377		475 ± 5		99 ± 5
240		285		483 ± 5		198 ± 5
249		196		361 ± 5	526 ± 10	165 ± 5
252		238		389		151 ± 5
20		275			575 ± 10	
21		280			580 ± 10	
22		240			605 ± 10	
23		280			565 ± 10	
mean		282		441 ± 5	585 ± 10	149 ± 5

A comparison of the data in the Table on the duration of normal and c-mitosis, beginning with the disappearance of the nuclear membrane, indicates that the course of c-mitosis is longer than that of the normal

one. This prolongation occurs in the period between the disappearance of the nuclear membrane and the falling apart of the chromatids. This period is a third to a half longer in c-mitosis than in normal mitosis. On the other hand the time between the separation of the daughter chromosomes and formation of the nuclei is about the same. This prolongation is less in comparison to c-mitosis in staminal hairs of *Tradescantia* in which c-mitosis lasts 2.8 times longer than normal mitosis (Wada 1940).

III. Spindle development

Normal mitosis. A detailed description has been given elsewhere (Bajer 1954, 1957, Bajer and Molè-Bajer 1956). The first sign of spindle formation is the appearance of a clear zone around the nucleus. This clear zone grows very slowly during the first 1—3 hours, and then rapidly for 30 min. to 1 hour. During this whole process the volume of the nucleus diminishes slowly by 5—20%. This may indicate that some substances are passing through the nuclear membrane into the clear zone. The amount of these substances is small and if they are considered in relation to the growth of the clear zone it is obvious that their quantitative participation in the formation of the clear zone may be disregarded. The shape of the clear zone depends on that of the cell; it is uniformly shaped in isodiametrical cells and larger towards the poles in longitudinal ones. When the clear zone reaches its maximal dimensions the nuclear membrane breaks. This rupture is followed by a short increase (lasting less than 5 min.) of the space occupied by the chromosomes. Immediately afterwards the aggregation of the whole chromosome group occurs. This stage of aggregation is called mitotic contraction stage (Bajer 1954). In this stage the substances of the clear zone and of the nucleus mix with each other. After the contraction stage the particles which did execute oscillations inside the nucleus in all directions before the breaking of the nuclear membrane oscillate in a direction parallel to the long axis of the spindle. This change in the oscillations may indicate that the gelification of the spindle appears at this stage. Also after the contraction stage the chromosomes are guided by the kinetochores in their movements.

Colchicine-mitosis. This description deals with the influence of colchicine applied since prophase. Two cases will be described:

a) The influence on cells in which the clear zone is well or partly developed.

b) The influence on cells in which the clear zone has not yet begun to form.

a) In most cells colchicine prevents further growth of the clear zone around the nucleus. The clear zone is not destroyed immediately but shows a tendency to diminish or disappear. The disappearance, if it occurs, is slow, and usually the clear zone may be discerned 6—8 hours after the beginning of colchicine action. However, the clear zone is not essential for the completion of c-mitosis and in some cells no clear zone was observed.

b) In cells which have no clear zone in early prophase, small clear zones are usually formed in later stages. In most cells they do not

reach the same size as in normal mitosis. During the further development they grow slowly, or may not change or diminish. After long action of colchicine on prophase (for several hours) the formation of the clear zone is stopped.

It must be stated that the beginning of the formation of the clear zone in c-mitosis is not quite understood. It was found that c-mitosis may proceed without formation of a clear zone. It was impossible, however, to answer the question why in some cells a clear zone is formed while in other cells in the same preparation it is not. It seems probable that colchicine does not act directly on clear zone formation, but on another process or component of the cell which is closely connected with the formation of a clear zone. The components may be the chromosomes whose activity seems to be connected with the formation a clear zone. It is also possible that the photodynamic effect of light by way of an influence on the chromosomes, may disturb the clear zone formation.

Though the first steps of the formation of a clear zone during c-mitosis are not quite understood its further development is clear. This is the period before the breaking of the nuclear membrane during which, in normal mitosis the cross sectional area of the nucleus diminished slightly. Three types of changes of the clear zone may be distinguished in c-mitosis and are illustrated in Fig. 1a—c; the clear zone may grow slightly before the disappearance of the nuclear membrane (Fig. 1a), it may not grow (Fig. 1b), or it may be reduced (Fig. 1c). In almost all cells the secondary growth of the clear zone after nuclear membrane breakage is characteristic of c-mitosis. After the rupture of the nuclear membrane the "clear zone" will be referred to as nuclear area, corresponding to the mitotic spindle of normal mitosis. The existence of the nuclear area was observed by DUSTIN, HAVAS and LITS (1937) and by BERGER and WITKUS (1943) in *Allium* root tips and described as achromatic sphere. The secondary growth of the clear zone (nuclear area) after the rupture of the nuclear membrane in c-mitosis but before it in normal mitosis, is one of the differences between normal and c-mitosis. Growth in these two cases is similar. In both cases it is characterised by the removal of the granular contents from a part of the cytoplasm which through this process seems to be transformed into the clear zone. The particles move approximately perpendicularly to the contour of the area occupied by the chromosomes.

In c-mitosis some time after the growth of the nuclear area (20 to 90 min.) this area decreases in size. In normal mitosis this decrease begins immediately after the break-down of the nuclear membrane. In c-mitosis the decrease continues until only the area occupied by the chromosomes remains. The area occupied by the chromosomes does

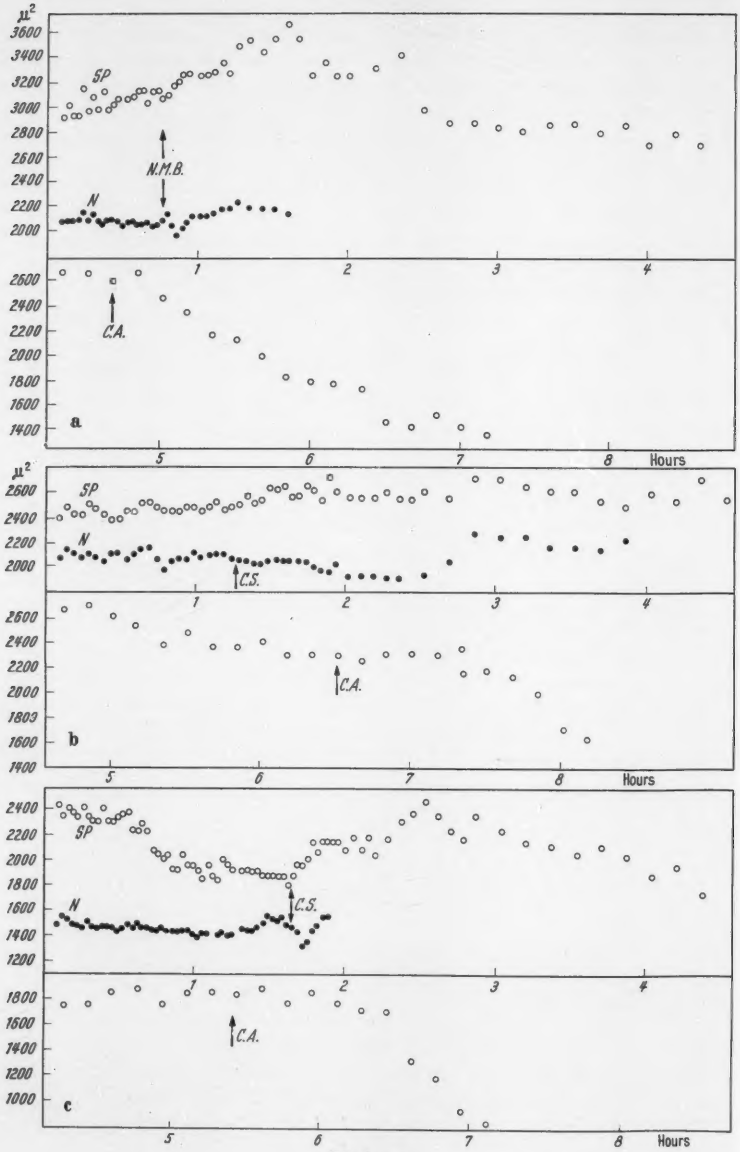

Fig. 1 a—c

not change much during the next 1—1.5 hour until c-telophase in which it changes quickly, i.e. during 1—1.5 hour. Then the area is reduced to less than 50%. These changes are connected with changes of chromosome structure in c-telophase. Sometimes even after the breaking of the nuclear membrane the nuclear area does not increase and does not change until the structural transformations of the chromosomes in telophase set in.

The cases described above concern cells in which a difference between the cytoplasm and the nuclear area is discernible. The main difference between the cytoplasm and the nuclear area is in the content of granules. These granules are numerous in the cytoplasm but rare in the nuclear area. Cells were also observed in which such a difference could not be seen and the chromosomes seemed to lie in the cytoplasm. In such cells it is of course, impossible to observe and describe changes of the nuclear area.

IV. The mitotic contraction stage

A necessary condition for the occurence of the contraction stage seems to be the existence of a clear zone. Usually even the partial formation of the clear zone is sufficient for a subsequent contraction stage. In cells where the clear zone is not formed no contraction stage was observed. Also even when a clear zone is formed the aggregation of the chromosomes in the contraction stage may be restricted to a few chromosomes only (2—3 chromosomes).

The course of the contraction stage in c-mitosis is similar to that in normal division. After the nuclear membrane breaks, the area occupied by the chromosomes increases, this being followed by a characteristic aggregation lasting for a few minutes. During this aggregation the chromosomes are passively pushed towards the centre of the nucleus. On the graphs (Fig. 1 a and 1 c) showing the changes in the cross sectional area of the nucleus it is seen that the area occupied by the chromosomes decreases. The course of the contraction stage and the rapidity of the aggregation appear to depend on the same mechanical conditions as in normal cells, and also on the degree of the development of the clear zone. A necessary condition for the occurence of the contraction stage

Fig. 1 a—c. Development of the clear zone and the contraction stage under influence of colchicine. Three different possibilities. The cross-sectional area of the clear zone (*SP*), later the space occupied by the chromosomes (*N*), are plotted against time. (a) The clear zone grows slowly before the nuclear membrane breaks (*N.M.B*) and rapidly after it. From preparation to 0 time: 32 min. The increase of the nuclear area after *N.M.B.* is followed by an aggregation of the chromosomes. *C.A.*—beginning of anaphase. Cell No. 179. (b) The clear zone does not grow before the contraction stage (*C.S.*). The *C.S.* is only partial, a few chromosomes on one side of the nucleus aggregate. Therefore the contraction stage is not recognisable on the graph, although clearly visible during projection of the film. From preparation to 0 time: 2 hours. 17 min. Cell No. 207. (c) The clear zone decreases before *C.S.* and grows after it. The contraction stage is very pronounced. From preparation to 0 time: 55 min. Cell No. 254

Fig. 2. The paths of the kinetochores during prometaphase and metaphase in normal mitosis. The outlines of the chromosomes show their position immediately before anaphase. Kinetochores—black circles, arrows—direction of anaphase movement. Comp. Fig. 10 for micrographs of the same cell. Cell No. 281

Fig. 3. The paths of the kinetochores during c-prometaphase. Black circles—positions of kinetochores just before c-anaphase. An example where most chromosomes move in one direction (upper left corner) due to external mechanical forces outside the nucleus. Micrographs of this cell in Fig. 6. Cell No. 240

seems to be the abrupt disappearance of the nuclear membrane. During normal mitosis this process may not be simultaneous around the nucleus and under the colchicine action it seems to be even less synchronised.

From these observations it can be concluded that the contraction stage may occur in c-mitosis and that for its normal course two events are necessary: the formation of the clear zone and the abrupt rupture of the nuclear membrane. In c-mitosis no differences were found in the behaviour of the particles executing Brownian movements between the chromosomes before and after the contraction stage. They perform irregular movements with no priviledged direction, independently of the stage of c-mitosis. This may support the suggestion that the nuclear area has no organized structure in c-mitosis.

V. C-prometaphase

Normal mitosis. After the contraction stage the following types of chromosome arm and kinetochore movements may be distinguished during normal mitosis (Bajre and Molè-Bajer 1956, Bajer 1958a, b). These movements lead to metaphase plate formation.

1. Kinetochore movements. (a) Movements parallel to, or partly across, the spindle towards the equatorial plate; (b) oscillatory movements about the long axis of the spindle; (c) temporary movements towards the pole and then back

Fig. 4. The paths of the kinetochores during c-prometaphase (a) and c-anaphase und c-telophase (b). No privileged direction is observed in (a), but visible in (b) during c-telophase as a result of mechanical forces outside the nuclear area. Cell No. 207

towards the plate; (d) revolving movements. During the movements a and c the kinetochores are pulling the arms of the chromosomes.

2. Arm movements. (a) Revolving movements i.e. uncoiling of sister chromatids (maximal velocity 0.7 revolutions/min.); (b) oscillatory movements parallel or perpendicular to the long spindle axis; (c) straightening of the arms; (d) *abrupt bending*

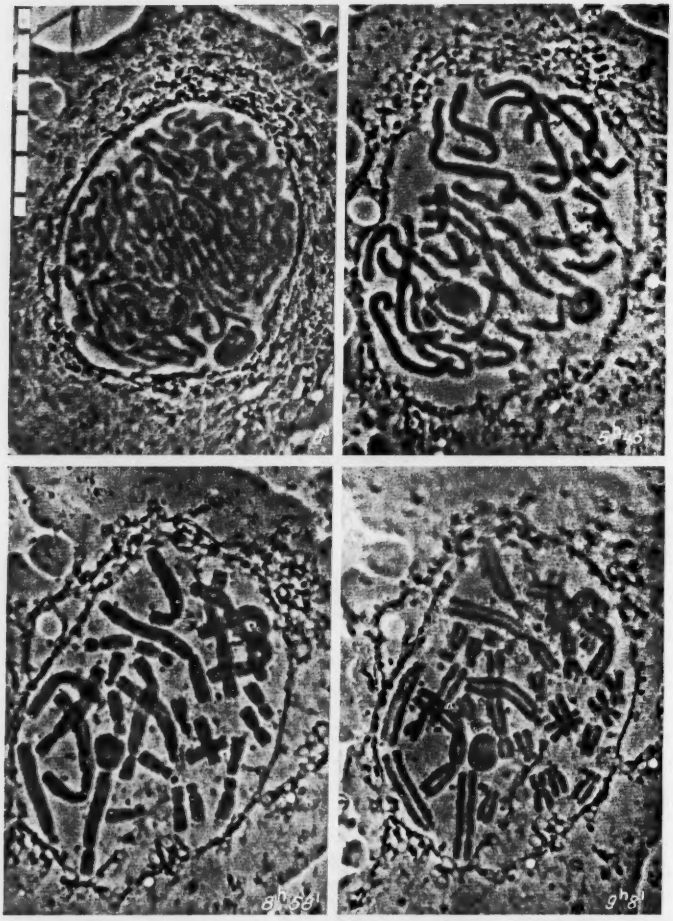

Fig. 5. The course of c-mitosis in a flattened cell. 50 ppm. of colchicine in agar. From preparation to 0 time: 1 hour. 17 min. Times after 0 time given on the micrographs. From 5 hours. 45 min. to 9 hours. 18 min. the changes in position of the individual chromosomes can be followed. Slight growth of nuclear area (5 hours. 45 min.). Typical unorientated c-metaphase 8 hours. 58 min. C-anaphase with only some chromosomes divided at first (9 hours. 8 min.) and all chromosomes divided later (9 hours. 18 min.). Notice that the chromosomes are usually parallel or perpendicular to each other, and that chromosomes which are placed above others tend to lie a right angles (cf. the differences in their position at different times). In c-telophase the structural changes begin at the periphery of the nucleus, comp. 11 hours. 38 min. with 14 hours. and 23 hours. 13 min. 35 mm film. Scale with 10 μ intervals. Cell No. 126

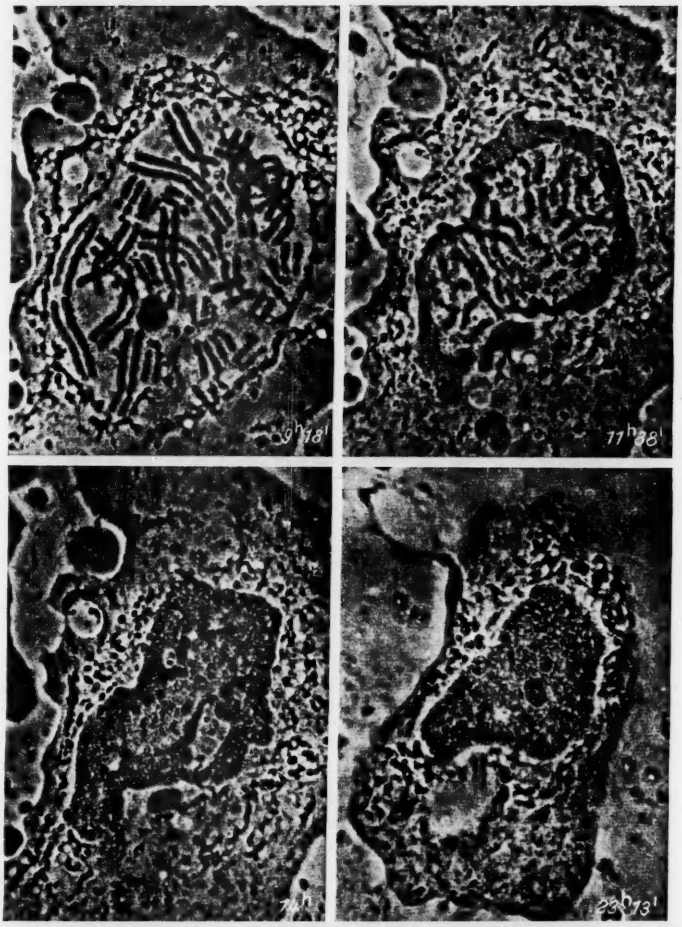

Fig. 5 (Continued)

movements (BAJER 1958b). These latter movements are very strange movements executed by the arms: the arm is suddenly pushed towards the plate and then almost immediately straightened and points towards the pole. It was suggested (BAJER 1958b) that these movements are caused by structural changes inside the normal mitotic spindle. The movements described above (a—d) may not depend on the kinetochore movements and the arms may execute them even when the kinetochores are motionless.

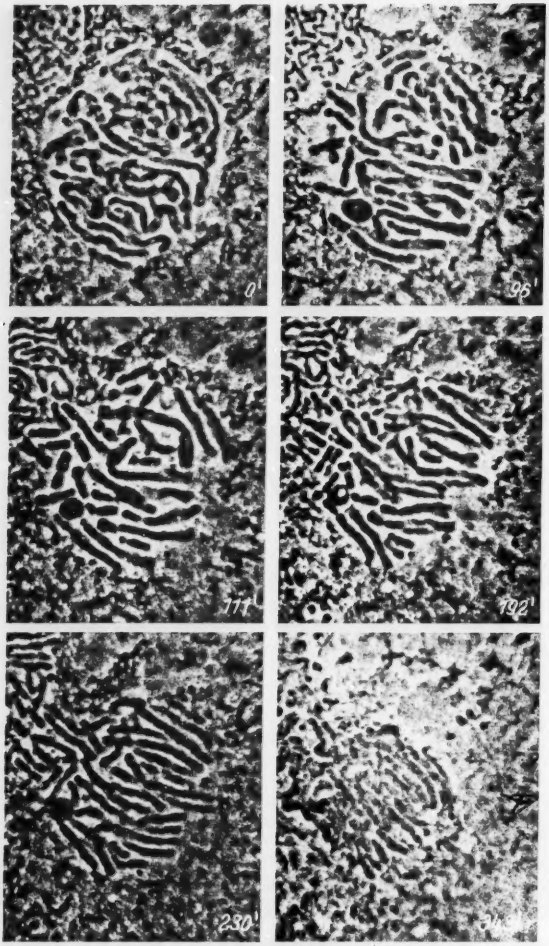

Fig. 6. Prophase without clear zone formation and without growth of it after disappearance of the nuclear membrane (*N.M.B*), comp. p. 337. Times after 0 given on the micrographs. The paths of the kinetochores are shown in Fig. 3. 16 mm film. Scale with 10 μ intervals
Cell No. 240

C-mitosis. In cells influenced by colchicine the movements before the falling apart of daugther chromosomes are less complicated than in normal mitosis (Fig. 2). The considerable changes of arrangement of

the chromosomes are the result of the cooperation of some simple movements. During the whole division not even a trace of kinetochore activity exists. The movements result from four main tendencies of chromosome behaviour:

1. The chief factor responsible for the changes of arrangement of the chromosomes is the very strong tendency of the chromosomes to straighten themselves. They have a tendency to form rod shaped bodies.

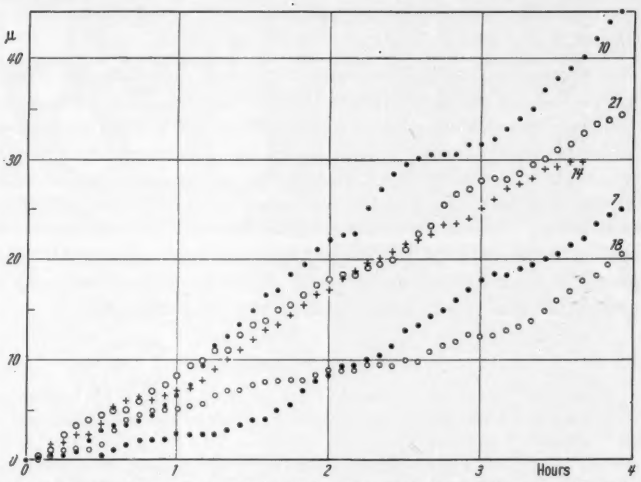

Fig. 7. The chromosome movements during c-prometaphase. Measurements made on the kinetochores. The total length of the path is plotted against the time. From the graph the c-prometaphase velocities can be calculated. Cell No. 207

The degree of straightening achieved depends on the mechanical conditions in the cell, such as degree of flattening, the dimensions of the clear zone, etc. In the majority of flattened cells, if they are not too much flattened, most of the chromosomes have straightened by c-metaphase. In very flattened cells this may not occur, although such an attempt is plainly visible in the ciné-film of these cells.

The straightening of large chromosomes causes both a change in their own positions and the shifting of other chromosomes, especially the smaller ones. This is especially visible in flattened cells where most of the chromosomes are arranged in one layer.

2. *The chromosomes change their dimensions* i.e. *they shorten*, and consequently they may occupy a smaller space.

3. The *sister chromatids uncoil* and straighten simultaneously. During c-prometaphase the speed of uncoiling is slow but is faster in

c-anaphase when it plays an important role during the falling apart of the chromatids.

4. The *oscillations* and changes of position of the chromosomes in consequence of the "*currents*" caused by changes of cell shape, flattening, the pressure exerted by changes in the neighbouring nuclei etc. These movements are easily discernible. The paths of the chromosomes during prometaphase are illustrated in Fig. 3, 4a (cf. also Fig. 7) and the movements occuring after c-anaphase and during restitution nucleus formation in Fig. 4b.

The cooperation of all these events may cause a considerable change in the position of the chromosomes during c-prometaphase. Fig. 3 and 4a illustrate these changes and a comparison with Fig. 2 (prometaphase movements during normal mitosis) show the differences from normal mitosis. The movements in c-mitosis are not directed and no arrangement which could be compared to metaphase plate is formed (Fig. 5, 6). This is mostly due to the complete inactivity of the kinetochores in c-mitosis. Dependent on the mechanical conditions unoriented metaphases (Fig. 5) or ball metaphases (Fig. 8) are formed. These types of c-metaphases were described by Barber and Callan (1943).

VI. Three phases in mitosis

As in normal mitosis (Bajer 1958b) there are three phases in the movements between the contraction stage and c-anaphase. There is a continuous transition between one phase and the next.

1. The phase after the contraction stage. Immediately after the contraction stage either no movements or very slow ones are observed.

2. This phase is the period of vigorous movements and the main changes of chromosome arrangements.

3. The second period of rest. This is a phase comparable with normal metaphase. The chromosomes usually execute only slight oscillations. This period is terminated by the lapse of chromatid pairing and by the falling apart of the daughter chromosomes.

C-prometaphase leads to c-metaphase which is comparable to normal metaphase, if the relative arrangement of the chromosomes is disregarded. The differences are caused by the lack of active kinetochore movements. The movements in normal mitosis are the consequence of cooperation between the kinetochores and the spindle. The absence of kinetochore activity results in a quite different pattern of chromosome movements and final arrangement. The arrangement in c-mitosis is caused by movements and factors which cannot play a main role in normal division, although they do exist. It is of some importance that the abrupt bending movements are absent in c-mitosis. This supports the suggestion (Bajer 1958b) that these peculiar movements are caused by changes in the organization inside the spindle.

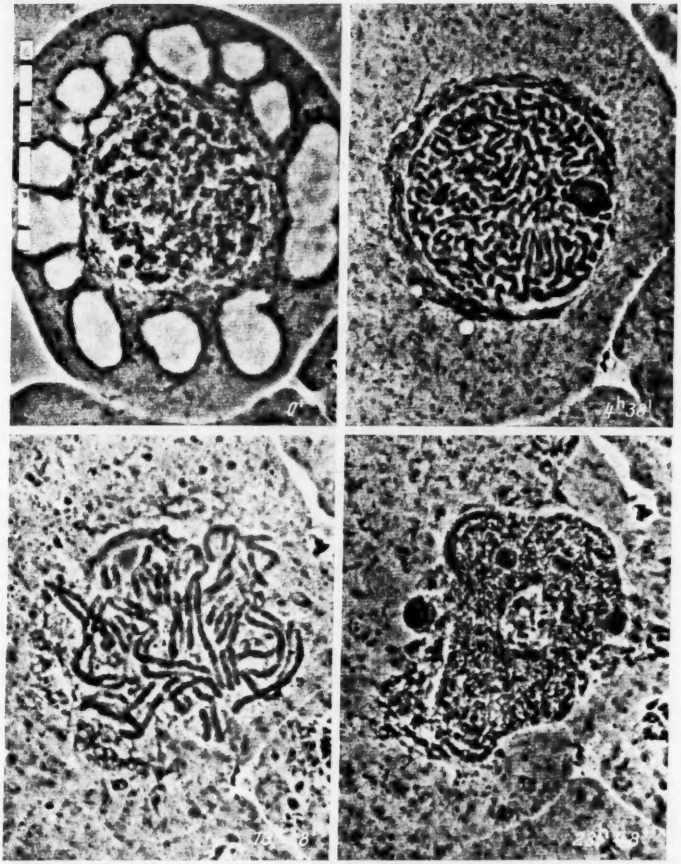

Fig. 8. Partly flattened cell showing c-anaphase after typical ball metaphase. No clear zone formed. C-mitosis after colchicine treatment at very early prophase. From preparation to 0 time: 33 min. Times after 0 given on the micrographs. 35 mm Film. Scale with 10 μ intervals. Cell No. 103

VII. Do chromosomes bear electric charge ?

Two obvious tendencies are found in the movements of the chromosomes between c-prometaphase and c-telophase which may be of some theoretical significance. These tendencies can easily be recognised in flattened cells where the mechanical conditions permit the majority of the chromosomes to be arranged in only one layer. However they are also found in unflattened cells.

The first tendency is that during the whole course of the movements i.e. in the period after the disappearance of the nuclear membrane until the structural changes of the chromosomes occur in c-telophase, the chromosomes do not touch each other. Before and after this period they may do so. If one chromosome pushes another, e.g. during the straightening of large arms, there is always a small, but distinct, space between the pushing and pushed chromosome. There seems to be a kind of barrier preventing the chromosomes from coming too close together.

Secondly there is a tendency for the chromosomes or chromosome parts to arrange themselves parallel or perpendicular to each other. During c-prometaphase most neighbouring chromosomes are so arranged. If two chromosomes are situated one above the other there is a tendency for them to form an angle of 90°. This tendency is clearly seen during straightening of the arms in c-anaphase (352—353), when, after separation, the chromatids tend to arrange themselves perpendicular (Fig. 11).

Also if a chromosome arm forms a loop the angle at the crossing is approximately 90°. These features are easily seen in Fig. 5.

These tendencies of arrangement may be easily explained by assuming that the chromosomes bear an electric charge. Such an assumption was made many years ago by Fol and then by Lillie (cited from Schrader 1953) and Kuwada (1929). A number of experiments done by different workers seem to indicate that the chromosomes do bear an electric charge (Botta 1932, Churney and Klein 1937, Kamiya 1937, Lehotzky 1936a, b). If this is correct the facts described above might be considered as an additional proof. The charge would appear in prophase and disappear in telophase, thus the formation of compact chromosome group in telophase and the increasingly looser arrangement in prophase would also find a simple explanation.

The repulsion of chromosomes during c-mitosis was also reported by a number of workers, especially Brues and Cohen (1936), Brues and Jackson (1937) and Barber and Callan (1943). The main objection is that it is not known that the chromosomes never touch each other in these stages. They do in fixed preparations (e.g. Bowen and Wilson 1954, Hyppio, Tsou and Wilson 1955, Levan 1954). This, however, may be caused by shrinking during fixation. In some cases i.e. during the formation of bridges or when chromosomes stick together they touch each other. Such effects have not been observed in normal mitosis. The question whether the chromosomes under other conditions *in vitro* touch each other remained to be answered. In the experiments reported here the chromosomes do not seem to come into actual contact with each other.

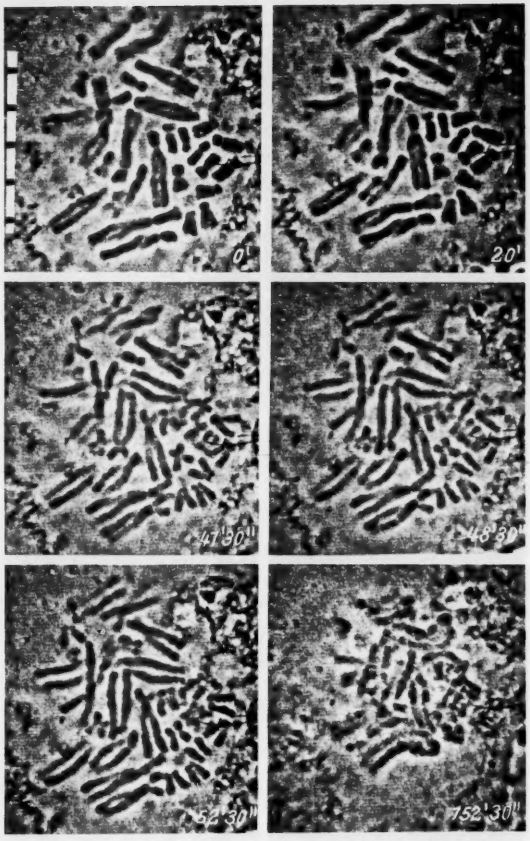

Fig. 9. Formation of c-pairs before c-anaphase. Times after 0 given on the micrographs. 16 mm film. Scale with 10 μ intervals. Cell No. 247

VIII. C-metaphase and c-anaphase

The formation of c-pairs (Figs. 9, 12) was described in an early contribution to the cytological analysis of c-mitosis by LEVAN (1938, 1939) as lapse of chromatid pairing and repulsions of chromatids. This stage is often described as c-metaphase. However, the beginning of c-metaphase seems to occur earlier. The process of the formation of c-pairs is short in comparison to the long period of rest before it, and it may be considered

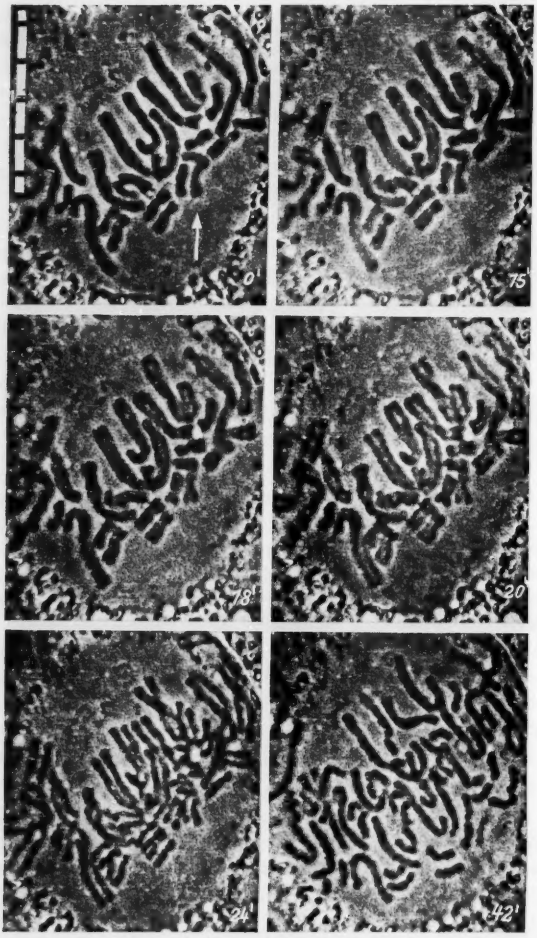

Fig. 10. Formation of "c-pairs" before normal anaphase. This event is most clearly visible in small chromosomes (marked by arrow). Times after 0 given on the micrographs. Comp. also Fig. 2 and graph in Fig. 12. 16 mm film. Same magnification as Fig. 7. Cell No. 281

as preparation for the separation of the chromosomes in anaphase. The formation of c-pairs is not a necessary condition for c-anaphase and in some chromosomes, or even in whole cells, it may not occur. The duration

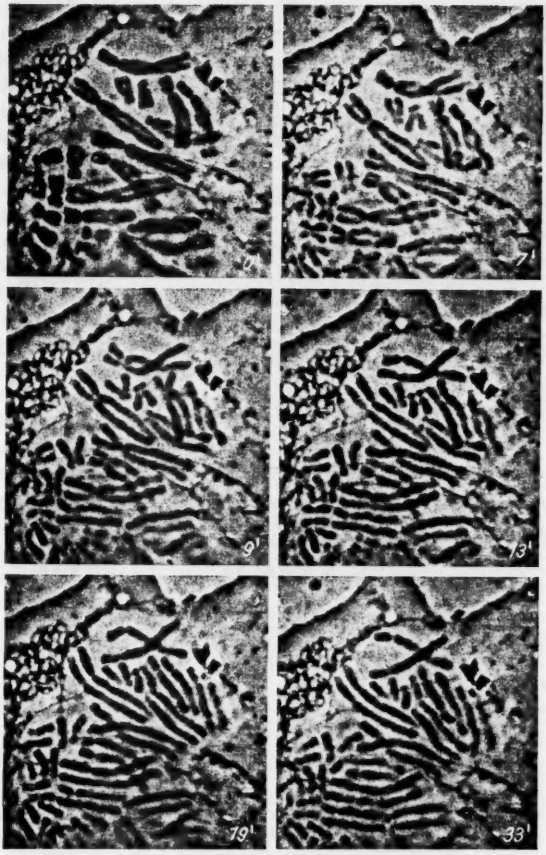

Fig. 11. Peculiar movements of certain large daughter chromosomes in c-anaphase (see uppermost chromosome). Times after 0 given on the micrographs. 16 mm film. Same magnification as Fig. 10. Cell No. 179

of the formation of c-pairs is not the same in different cells (Fig. 12). It may be very abrupt and last less than 3 min. or it may be slower and last more than 10 min. In most chromosomes with short arms (small chromosomes), where the c-pairs are plainly visible, the ends of the two chromatids move apart from each other. In chromosomes with longer arms this is usually not the case. In these chromosomes the

formation of c-pairs begins near the kinetochores. A longitudinal split appears which moves towards the ends of the arms and at the same time increases in breadth. In consequence the two daughter chromosome arms may often look as if they are connected at the kinetochore and at the ends of the arms with a split between them, the split being narrower at each end. Such splits are most distinctly visible in the shorter arms of large chromosomes. The ends of longer arms, which in this period are coiled around each other seldom show typical c-pairs. Similar details of c-pairs formation was already described by LEVAN (1938) and an interpretation was given by ÖSTERGREN (1944).

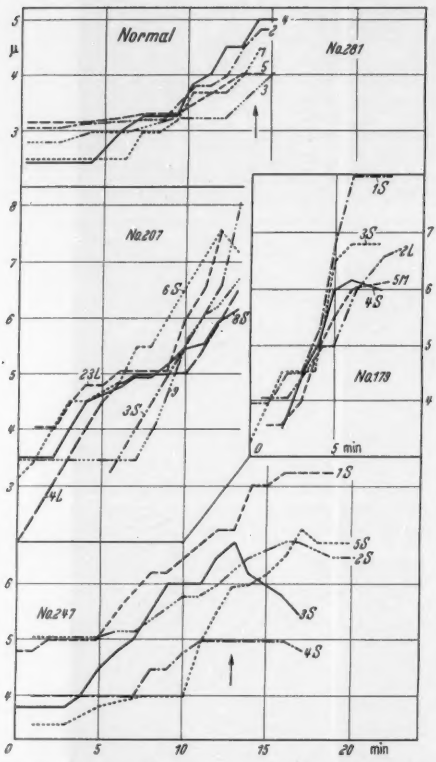

Fig. 12. The separation of arm ends before normal and c-anaphase. The distance between the arm ends during c-pair formation is plotted against time. Normal mitosis, cell No. 281 (cf. Fig. 10) and c-mitosis—other cells. Arrows (cells No. 281, 247) indicate beginning of anaphase and c-anaphase respectively. The number of cells and the numbers of the chromosomes are given; cf. Fig. 11 (cell 179) and Fig. 4 (cell No. 207). Abbreviations of dimensions of the chromosomes: *S* small, *M* medium, *L* large

The next step of c-anaphase is the breaking of the kinetochore junction. This process is synchronised to the same degree as in normal anaphase i.e. the time interval between separation at different kinetochores does not exceed 3 min. Thereafter the daughter chromosomes fall apart and form a characteristic "ski pairs" (LEVAN 1938). The smallest distance between the chromosomes in "ski pairs" is the same as in prometaphase (approximately 2—3 μ). The chromosomes which had arms coiled around each other uncoil vigorously, and at the same

time straighten in a few minutes. After this first step, the mechanism of which is not quite clear, the chromosomes may move over longer distances, all the time undergoing oscillations. Their paths are irregular and the kinetochores are completely inactive. The paths of the chromosomes are given in Fig. 13 and the graph of the movements in Figs. 14, 15; the paths of the kinetochores were determined because their position in the chromosomes could be distinguished. The graph (Fig. 15) indicates that the velocity of the single kinetochore is of the order 0.3 μ min. which is 3—6 times slower than during normal anaphase separation. The paths of the movements during restitution nucleus formation which are directed towards a particular centre are shown in Fig. 4b.

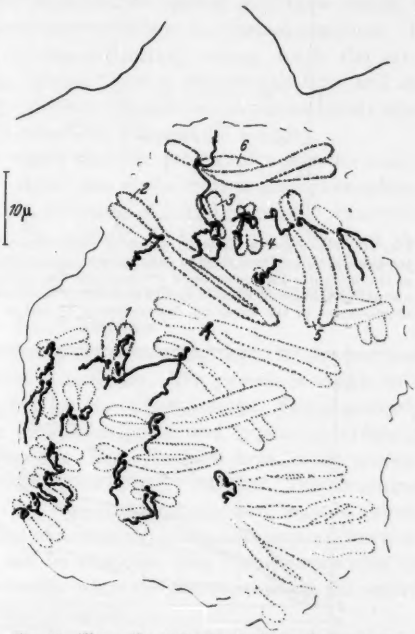

Fig. 13. The paths of the kinetochores during c-anaphase. Cf. the path of the chromosome 6 with its micrographs in Fig. 11 and the graph in Fig. 14. Cell No. 179

In exceptional chromosomes after the disrupture of the kinetochore junction the daughter kinetochores move over a considerable distance (even 8 μ or more cf. Fig. 14). During this movement the chromosomes may be characteristically bent at the kinetochore, similar to normal anaphase chromosomes. The graph (Fig. 14, chromosome No. 6) of this movement also resembles the curve for normal anaphase separation, but there is no activity of the kinetochores. Such a movement is only found in flattened cells, in which long daughter arms are coiled and in which the conditions do not permit the elimination of this coil during the separation of the daughter kinetochores. The strong tendency of the daughter chromosomes to straighten gives an illusion of kinetochore activity because the chromosomes are bent at the kinetochores. As the angles between the crossed daughter chromosomes increase, the process of arm straightening offers only a partial explanation of the separation of the kinetochores (cf. p. 348). Because the movement is similar to that caused by elastic forces the shape of the curve may resemble that for normal anaphase (Hughes and Swann 1948, Bajer and Hrynkiewicz 1951) though the mechanism of the movement is quite different.

A detailed comparison of the course of normal anaphase with c-anaphase indicates some common features at the beginning of anaphase

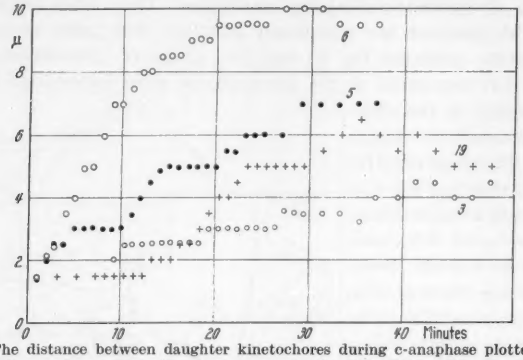

Fig. 14. The distance between daughter kinetochores during c-anaphase plotted against the time. The numbers refer to the chromosomes in Fig. 13 (cell No. 179). The movements of the daughter kinetochores of chromosome No. 6 are peculiar as they resemble those of normal anaphase, cf. Figs. 11 and 13 and for comparison the movements of other daughter kinetochores in the same cell (chromosome 5) and in Fig. 4 (chromosomes 3 and 19, cell No. 207)

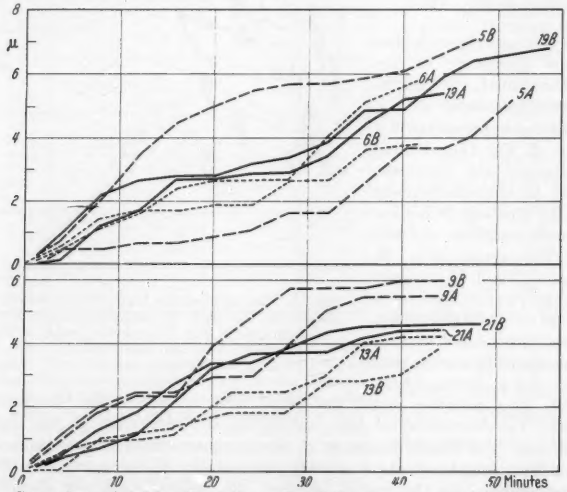

Fig. 15. C-anaphase; total length of the paths of the chromosomes (kinetochores chosen for measurements) plotted against the time. The curves differ greatly. Most of them do not resemble the curves for normal anaphase in shape or slope. Cell No. 207

i.e. in the process of chromosome splitting. It is obvious, however, that the further stages have nothing in common. The process of the separa-

tion of daughter kinetochores seems to be exactly the same in the two types of mitosis. It appears that the process of c-pair formation described here and elsewhere in c-mitosis also takes place in the course of normal mitosis, although it is slightly different. During normal mitosis the arm ends are not so widely separated as in c-mitosis and therefore this process may be less plainly visible. In normal mitosis configurations similar to c-pairs are formed when the mechanical conditions permit it. Their formation is not a necessary condition for normal anaphase. In normal mitosis (Figs. 10, 12) the separation cannot reach the same degree as during c-mitosis because there is not enough time and the chromosomes begin to move towards the poles almost immediately after the splitting, as result of kinetochore and spindle activity.

In conclusion it can be stated that the process of c-pairs formation characteristic of c-mitosis is found also at the start of normal anaphase, and this may indicate that the processes of initial chromatid separation in c- and normal anaphase are similar. It is also probable that the factors causing the chromatid separation are similar. If this is correct the c-pairs formation would be the first stage of normal anaphase.

IX. C-telophase

In telophase the chromosomes are drawn together. In the previous stages they do not show such a tendency. The process is visible as a decrease in the area occupied by the chromosomes. Simultaneously vigorous movements of the cytoplasm begin, and typical cytoplasmic "boiling" (BARBER 1939) appears. The cytoplasm invades the nuclear area and pushes the chromosomes more closely together. The structural changes in the chromosomes are very characteristic, and begin in almost all cells from the edges of the chromosome group and proceed towards the centre. Very often it can be observed that the chromosomes at the edges are changed considerably while the chromosomes at the centre retain their original appearance (Fig. 5).

Summary

The influence of colchicine (50 ppm.) on the development of the spindle and chromosome movements in endosperm of *Haemanthus katharinae* BAK. was studied with ciné-micrographic methods.

1. It was found that the cytoplasmic component of the mitotic spindle i.e. the clear zone has a tendency to decrease in c-mitosis, before the nuclear membrane breaks, while it grows in normal mitosis. After long action of colchicine the clear zone may not be present but this does not influence the course of c-mitosis.

2. The clear zone in c-mitosis often grows considerably after the nuclear membrane breaks, while in the corresponding stage in normal mitosis in decreases.

3. The mitotic contraction stage may, or may not, occur in c-mitosis. Conditions for its occurrence are the presence of a clear zone and probably an abrupt disrupture of the nuclear membrane.

4. In c-mitosis before and after the nuclear membrane breaks no difference in the behaviour of the particles executing irregular movements is found, in the nuclear area, while there is a pronounced difference in normal mitosis.

5. Chromosome movements in c-mitosis are much simpler than in normal mitosis. No activity of the kinetochores was found.

6. The movements of the chromosomes during c-mitosis are mainly a combination of: (a) the strong tendency of the chromosomes to straighten, (b) the shortening of the chromosomes, (c) the oscillations of the chromosomes and (d) the uncoiling of daughter chromatids.

7. No trace of the peculiar movements (abrupt bending movements) found in normal mitosis, were seen in c-mitosis. It is therefore suggested that these movements are a result of the activity of the normal spindle.

8. The preparation for normal and c-anaphase is similar. The formation of c-pairs, which had previously only been described for c-mitosis was shown to occur in normal mitosis. The differences between c-pairs in c-mitosis and similar pairs in normal mitosis are described.

9. The behaviour of the chromosomes in c-mitosis seem to indicate that they bear an electric charge in the period from prometaphase to early telophase.

10. The structural changes of the chromosomes leading to the formation of the restitution nucleus begin in the peripheral part of the nucleus.

Acknowledgments. It is a great pleasure for the author to express her deepest gratitude to Miss AUDREY M. GLAUERT of Strangeways Research Laboratory, Cambridge, England, and to Dr. GUNNAR ÖSTERGREN of Institute of Genetics, University of Lund, Sweden, for very valuable suggestions, kind and constructive criticism and much help during the preparation of this paper.

References

BAJER, A.: Absolute viscosity and living mitotic spindle structure. Acta Soc. bot. poloniae **22**, 331—348 (1953). — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. I. Acta Soc. bot. poloniae **23**, 383—412 (1954). — Living smears from endosperm. Experientia (Basel) **11**, 221 (1955). — Ciné-micrographic studies on mitosis in endosperm. III. The origin of the mitotic spindle. Exp. Cell Res. **13**, 493—502 (1957). — Cine micrographic studies on mitosis in endosperm. IV. Exp. Cell Res. **14**, 245—256 (1958a). — Cine-micrographic studies on mitosis in endosperm. V. Exp. Cell Res. **1958**b (in the press).

— and A. HRYNKIEWICZ: Notes on the anaphase mechanism and the energy of chromosome movement. Acta Soc. bot. poloniae **21**, 5—15 (1951).

—, and J. MOLÈ-BAJER: Endosperm-material for study on the physiology of cell division. Acta Soc. bot. poloniae **23**, 69—110 (1954). — Ciné-micrographic

studies on mitosis in endosperm. II. Chromosome, cytoplasmic, and Brownian movements. Chromosoma (Berl.) **7**, 558—607 (1956).

BARBER, H. N.: The rate of movement of chromsomes on the spindle. Chromosoma (Berl.) **1**, 33—50 (1939).

—, and H. CALLAN: The effect of cold and colchicine on mitosis in the newt. Proc. roy. Soc. B **131**, 258—271 (1943).

BENITEZ, H. H., M. R. MURRAY and E. CHARGAFF: Studies on inhibition of the colchicine effect on mitosis. Ann. N.Y. Acad. Sci. **58**, 1288—1302 (1954).

BERGER, C., and E. WITKUS: A cytological study of c-mitosis in the polysomatic plant *Spinacia oleracea*, with comparative observation on *Allium cepa*. Bull. Torrey bot. Club **70**, 457—467 (1943).

BOTTA, B.: Riserche sulla carica e sul transporto elettrico della figura cromatica delle cellule in mitosi di cuore embrionale di polo. Arch. exp. Zellforsch. **12**, 455—464 (1932).

BOWEN, C. C. and G. P. WILSON: A comparison of the effects of several antimitotic agents. J. Hered. **45**, 2—9 (1954).

BRUES, A., and A. COHEN: Effects of colchicine and related substances on cell division. Biochem. J. **30**, 1363—1368 (1936).

—, and E. JACKSON: Nuclear abnormalities resulting from inhibition of mitosis by colchicine and other substances. Amer. J. Cancer **30**, 504—511 (1937).

BUCHER, O.: Zur Kenntnis der Mitose. VI. Der Einfluß von Colchicin und Trypaflavin auf den Wachstumsrhythmus und auf die Fibrozytenkulturen. Z. Zellforsch. **39**, 283—322 (1939).

CORNMAN, I.: Alleviation of mitotic poisoning by glucose. J. cell. comp. Physiol. **35**, 301—302 (1950).

D'AMATO, F.: Ricerche sull'attività citologica di alcuni compositi organici con particolare riguardo alla colchicino-mitosi e agli effetti tossici. Caryologia (Pisa) **1**, 49—78 (1948). — The quantitative studies of mitotic poisons by the *Allium cepa* test. Data and problems. Protoplasma **39**, 423—433 (1950).

DUSTIN, A., L. HAVAS and F. LITS: Action de la colchicine sur le divisions cellulaires chez les végétaux. C. R. Ass. Anat. **32**, 170—176 (1937).

EIGSTI, O. J., and P. DUSTIN jr.: Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry, p. 470. Ames, Iowa: Iowa State College Press 1955.

GAULDEN, M. E., and J. G. CARLSON: Cytological effects of colchicine on the grasshopper neuroblast in citro, with special reference to the origin of the spindle. Exp. Cell Res. **2**, 416—433 (1951).

HUGHES, A. F.: The effect of inhibitory substances on cell division. A study on living cells in tissue cultures. Quart. J. micr. Sci. **91**, 251—277 (1950).

—, and M. M. SWANN: Anaphase movement in the living cell. J. exp. Biol. **25**, 45—70 (1948).

HYPPIO, P. A., T. M. TSOU and G. B. WILSON: Some notes on the "c-mitotic" action of colchicine and technical lindane. Cytologia (Tokyo) **20**, 166—176 (1955).

INOUÉ, S.: The effect of colchicine on the microscopic and submicroscopic structure of the mitotic spindle. Exp. Cell Res. **2**, 305—318 (1952). — Polarisation optical studies of the mitotic spindle. Chromosoma (Berl.) **5**, 487—500 (1953).

KAMIYA, N.: Untersuchungen über die Wirkung des elektrischen Stromes auf lebende Zellen. I. Das Verhalten der mitotischen Figur unter der Wirkung des Gleichstromes. Cytologia Fujii Jub: (Tokyo), Bd. 2, 1036—1042 (1937).

KUWADA, Y.: Chromosome arrangement. I. Mem. Coll. Sci. Kyoto **4**, 199—264 (1929).

LEHOTZKY, P.: Die Wirkung des elektrischen Stromes auf lebende Zellen und Gewebe. Arch. exp. Zellforsch. **18**, 3—12 (1936a). — Über einige kolloid-

chemische Eigenschaften der chromatischen Substanz. Arch. exp. Zellforsch. **18**, 259—363 (1936b).

Levan, A.: The effect of colchicine on root mitose in *Allium*. Hereditas (Lund) **24**, 471—486 (1938). — Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances. Hereditas (Lund) **25**, 87—96 (1939). — Colchicine-induced c-mitosis two mouse ascites tumours. Hereditas (Lund) **40**, 1—64 (1954).

Mazia, D.: The organization of the mitotic apparatus. Symp. Soc. exp. Biol. **9**, 335—357 (1955). — The life history of the cell. Amer. Sci. **44**, 1—32 (1956a). — Materials for the biophysical and biochemical study of cell division. Advanc. biol. med. Phys. **4**, 69—118 (1956b).

Molè-Bajer, J.: A simple method for examining the action of chemicals on mitosis in living endosperm. Acta Soc. bot. poloniae **24**, 619—625 (1955).

Nebel, B., and M. Ruttle: The cytological and genetical significance of colchicine. J. Hered. **29**, 3—9 (1938)

Östergren, G.: Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. Hereditas (Lund) **30**, 429—467 (1944).

Schrader, F.: Mitosis, 2. Aufl. New York: Columbia Univ. Press 1953.

Steinegger, E., and A. Levan: Constitution and c-mitotic activity of iso-colchicine. Hereditas (Lund) **33**, 385—396 (1947). — The c-mitotic qualities of colchicine, trimethyl, colchicinic acid and two phenanthrene derivatives. Hereditas (Lund) **34**, 193—203 (1948).

Stich, H.: Stoffe und Strömungen in der Spindel von *Cyclops strenuus*. Chromosoma (Berl.) **6**, 199—236 (1955).

Wada, B.: Lebendbeobachtung über die Einwirkung des Colchicins auf die Mitose insbesondere über die Frage der Spindelfigur. Cytologia (Tokyo) **11**, 93—116 (1940).

Dr. Jadwiga Molè-Bajer, Laboratory of Plant Physiology,
Jagellonian University, Grodzka 53, Cracow, Poland